

**Funktionelle Aspekte biologisch aktiver Komponenten aus
dem Regurgitat von *Spodoptera littoralis*-Larven**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Ing. (FH) Jelena Pesek M.Sc.

geboren am 20. Dezember 1981 in Dortmund

Prof. Dr. Wilhelm Boland (Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena)

Prof. Dr. Erika Kothe (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Prof. Dr. Hans-Georg Sahl (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)

Tag der öffentlichen Disputation: 29.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Summary	7
Einleitung	8
Indirekte Verteidigung von Pflanzen gegen herbivore Insekten	8
<i>Induktion pflanzlicher Verteidigung durch N-Acylaminosäure-Konjugate</i>	10
<i>Bedeutung und Herkunft von N-Acylaminosäure-Konjugaten in Lepidoptera-Larven</i>	12
Die biologische Bedeutung von Eisen für Bakterien	13
<i>DPS-Proteine als Schutz vor ROS</i>	14
<i>Eisenaufnahme durch Siderophore</i>	15
<i>Kontrolle der Genexpression durch Eisen</i>	18
<i>Eisenmetabolismus in Insekten</i>	19
8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure – ein Chinolinderivat aus dem Regurgitat von Lepidoptera-Larven	20
<i>Biosynthese von 8-HQA</i>	22
Aufgabenstellung	25
Material und Methoden	26
Allgemeines	26
<i>Hersteller</i>	26
<i>Puffer</i>	26
Mikrobiologie	26
<i>Kultivierung von Bakterien und Pilzen</i>	26
<i>Pilz- und Bakterienstämme</i>	27
<i>Agardiffusionstests</i>	28
Molekularbiologie	28
<i>Allgemeine Techniken</i>	28
<i>Klonierung von gdh, puo und afp</i>	31
<i>Heterologe Proteinexpression in E. coli</i>	34
<i>Southern Blots</i>	34
Proteinchemie	36
<i>Proteinreinigung</i>	36
<i>Proteinkonzentration</i>	37
<i>Polyacrylamid-Gele</i>	37
<i>Western Blots</i>	39

<i>In-Gel-Assays</i>	40
<i>Konjugationsaktivität</i>	41
Analytik und Synthesen	42
<i>HPLC-MS</i>	42
<i>Eisenbestimmung</i>	43
<i>Proteomics</i>	43
<i>Deuterierungen</i>	43
Aufzucht und Experimente mit Insekten	44
<i>Verwendete Insekten</i>	44
<i>Generelle Aufzucht der Insekten</i>	45
<i>Experimente mit Spodoptera-Larven</i>	46
Ergebnisse	48
Die Bildung von <i>N</i> -Acylaminosäuren durch bakterielle Enzyme	48
<i>Viele Bakterienstämme aus dem Larvendarm können N-Linolenoyl-L-glutamin bilden</i> ..	48
<i>Ein bekanntes Konjugationsenzym AAH kommt nicht in anderen Stämmen vor</i>	50
<i>Darmbakterien besitzen sehr unterschiedliche Konjugationsenzyme</i>	51
<i>Heterologe Expression konjugationsaktiver Enzyme</i>	56
Die Regulation von AAH, einem konjugationsaktiven DPS-Protein	59
<i>AAH wird in der stationären Wachstumsphase induziert</i>	59
<i>AAH wird nicht durch Stressfaktoren wie H₂O₂, osmotischen Stress, Temperaturveränderungen induziert, ist jedoch pH-abhängig</i>	60
<i>In Anwesenheit von Siderophoren wird AAH dauerhaft exprimiert</i>	61
<i>FeSO₄ (Fe²⁺) induziert AAH-Expression kurzzeitig</i>	63
<i>Eisenchelatoren hemmen die AAH-Expression</i>	65
8-HQA, ein Eisenchelator aus dem Darm von Lepidoptera-Larven	66
<i>Detektion von 8-HQA in Noctuidae-Arten</i>	66
<i>Antibiotika im Futter haben keinen Einfluss auf die 8-HQA-Synthese</i>	68
<i>Darmbakterien bilden keine 8-HQA</i>	70
<i>8-HQA inhibiert bakterielles Wachstum über Eisenkomplexierung</i>	71
<i>8-HQA inhibiert die Expression des DPS-Proteins AAH, außerdem die Aktivität zweier eisenhaltiger Proteine</i>	74
<i>8-HQA wird nicht über Eisen im Futter reguliert</i>	77
<i>8-HQA wird kontinuierlich gebildet und zum größten Teil ausgeschieden</i>	79
<i>Syntheseweg von 8-HQA</i>	81
<i>Verteilung und Syntheseort von 8-HQA in der Larve</i>	85
<i>8-HQA wird vorwiegend während der Larvenentwicklung produziert</i>	86

Diskussion	89
Die Bildung von <i>N</i> -Acylaminosäuren durch bakterielle Enzyme	89
Die Regulation von AAH, einem konjugationsaktiven DPS-Protein	91
8-HQA, ein Eisenchelator aus dem Darm von Lepidoptera-Larven	92
Referenzen	97
Anhang	107
Abkürzungen.....	107
Danksagung	110
Lebenslauf	113
Publikationen	114
Vorträge.....	114
Poster	114
Erklärung	115

Zusammenfassung

Im Regurgitat (Vorderdarminhalt) von *Spodoptera*-Larven befinden sich zahlreiche biologisch aktive Substanzen, welche in verschiedenen multitrophen Interaktionen eine Rolle spielen können. *N*-Acylaminosäure-Konjugate induzieren beispielsweise indirekte Verteidigungsstrategien einiger Pflanzen. Diese erkennen dadurch ihre Angreifer während des Fraßvorgangs und locken über z. B. Düfte Feinde der herbivoren Insekten an. Darmbakterien aus *Spodoptera exigua* sind in der Lage diese Konjugate zu synthetisieren ¹. Einer dieser Bakterienstämme, *Microbacterium arborescens* Se 14, besitzt ein Konjugationsenzym (AAH), das Homologien zu DPS-Proteinen (*DNA-protecting protein under starved conditions*) zeigt ². In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass AAH in anderen konjugationsaktiven Bakterien nicht vorkommt. Die Suche nach weiteren bakteriellen Konjugationsenzymen ergab für *Rhodococcus erythropolis* Hinweise auf eine Glutamatdehydrogenase. Für *Arthrobacter nicotianae* Se 35 gelang es nicht, ein Protein mit Konjugationsaktivität zu reinigen. Das wahrscheinlichste Konjugationsenzym war jedoch eine Putrescinoxidase, da diese in allen aktiven Proteinfractionen als Hauptprotein vorkam. Die bislang bekannten Konjugationsenzyme bilden keine homogene Gruppe. Auch ist die Konjugationsaktivität wohl eher eine Nebenaktivität des jeweiligen Proteins. Die Untersuchung der Regulation von AAH ergab, dass es wie andere DPS-Proteine ³⁻⁶ vorwiegend in der stationären Wachstumsphase gebildet wird. Eine Induktion durch oxidativen oder hyperosmotischen Stress konnte nicht beobachtet werden. AAH wird über Eisen (II) reguliert. Siderophore oder FeSO₄ induzierten die Expression von AAH, während Chelatoren seine Expression inhibierten. Diese Ergebnisse betonen, dass die Hauptfunktion von AAH wahrscheinlich die Entgiftung und Speicherung von überschüssigem Eisen ist.

Neben den *N*-Acylaminosäure-Konjugaten findet man im Regurgitat die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (8-HQA) in sehr hoher Konzentration. Hier konnte zunächst gezeigt werden, dass diese Komponente von der Larve selbst gebildet wird, da die untersuchte Darmmikrobiota nicht in der Lage war, 8-HQA zu produzieren. Zudem hatten Antibiotika im Futter der Larven keinerlei Einfluss auf die 8-HQA-Synthese. Die Funktion dieser Substanz scheint vielfältig. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 8-HQA bakterielles Wachstum über Eisenkomplexierung hemmt, da die Aktivität eisenhaltiger Enzyme inhibiert wurde. Eine Regulation der 8-HQA-Bildung über Eisen konnte nicht festgestellt werden. Die 8-HQA-Konzentration war aber stark abhängig vom Tryptophangehalt der Nahrung. 8-HQA ist ein Abbauprodukt von Tryptophan und wurde aus diesem kontinuierlich gebildet und ausgeschieden. Mit der Aufklärung des Biosyntheseweges wurde gezeigt, dass das sehr reaktive 3-Hydroxykynurenin eine Vorstufe ist. Analog zur strukturell ähnlichen Xanthurensäure in *Aedes aegypti* ⁷⁻⁹ könnte die Aufgabe von 8-HQA in *Spodoptera*-Larven die Eliminierung dieser toxischen Vorstufe sein. 8-HQA wurde vorwiegend während des Larvenstadiums gebildet, während in der Puppe die Vorstufe 3-Hydroxykynurenin akkumulierte, welche vermutlich für die Bildung von Augenfarbstoffen benötigt wird.

Summary

The regurgitant (foregut content) of *Spodoptera* larvae contains several biologically active compounds, which may play a role in diverse multitrophic interactions. *N*-acylamino acid conjugates induce indirect defence mechanisms in some plants. Thus, plants recognise their attackers during feeding and consequently attract enemies of the herbivore by the emission of odourous compounds. Gut bacteria of *Spodoptera exigua* are able to synthesise those conjugates ¹. One of these strains, *Microbacterium arborescens* Se 14, possesses a conjugation enzyme (AAH), which shows homology to DPS proteins (DNA-protecting protein under starved conditions) ². This work shows that AAH does not occur in other conjugation-active bacteria. In active protein fractions of *Rhodococcus erythropolis* was identified a glutamate dehydrogenase. In case of *Arthrobacter nicotianae* Se 35 a clean purification was not successful. Though, the most likely conjugation enzyme was a putrescine oxidase, since it was the main protein in all active fractions. Thus, the diverse conjugation enzymes do not account for a homogeneous group. In addition, conjugation activity probably is a side activity of each enzyme. Studying the regulation of AAH showed that it is preferentially formed in the stationary growth phase like other DPS proteins ³⁻⁶. It could not be observed an induction by oxidative or hyperosmotic stress. In contrast, AAH was regulated by ferrous iron. Siderophores or FeSO₄ considerably induced the expression of AAH, whereas chelators inhibited the expression. These data emphasise the main function of AAH as detoxification and storage protein of excessive iron.

In addition to *N*-acylamino acids, the 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid can be identified in very high concentrations in the regurgitant. Here it could be shown that this compound was synthesised by the larvae themselves, since the gut microbiota was not able to form 8-HQA. In addition, antibiotics in the larval diet had no impact on the 8-HQA biosynthesis. The function of 8-HQA appears to be diverse. In this work it could be shown that 8-HQA suppresses bacterial growth via iron complexation, since the activity of iron-containing enzymes was inhibited. It could not be observed a regulation of 8-HQA synthesis via iron. However, the 8-HQA concentration was strongly dependent on the tryptophan content of the diet. 8-HQA is a degrading product of tryptophan and is continuously formed and excreted. By elucidation of the biosynthetic pathway it could be shown that the very reactive 3-hydroxykynurenin also is a precursor. Similarly to xanthurenic acid of *Aedes aegypti* ⁷⁻⁹, the function of 8-HQA could be the elimination of this toxic precursor. 8-HQA was predominantly formed during the larval stage, whereas in the pupae the precursor 3-hydroxykynurenin accumulated, probably because it is needed for the pigmentation of the compound eyes.

Einleitung

Indirekte Verteidigung von Pflanzen gegen herbivore Insekten

Insekten sind die artenreichste Klasse aller Tiere auf der Erde und ein Großteil von ihnen ernährt sich von Pflanzenmaterial. Pflanzen sind im Gegensatz zu ihren Fraßfeinden fest an ihren Standort gebunden und scheinen diesen auf den ersten Blick hilflos ausgeliefert zu sein. In Wahrheit ist die Vielfalt pflanzlicher Verteidigungsmechanismen gegenüber herbivoren Insekten groß. Man kann dabei zwischen mechanischer und chemischer Abwehr unterscheiden. Mechanische Abwehrstrategien sind beispielsweise Stacheln (z. B. Rosen, Brombeeren), Dornen (z. B. Kakteen, Schlehen), Trichome (z. B. Nachtschattengewächse, Brennnesseln) oder Wachsschichten (z. B. Agaven) ¹⁰⁻¹². Zur chemischen Abwehr gehört die Bildung von Sekundärmetaboliten, welche giftig (Alkaloide wie z. B. Nikotin oder Morphin), abschreckend (z. B. Tannine) oder verdauungshemmend (z. B. Proteinaseinhibitoren) sein können ¹⁰⁻¹². Verteidigungsstrategien können konstitutiv oder induziert sein. Der Vorteil induzierbarer Mechanismen ist, dass Pflanzen nicht ständig Energie in die Verteidigung stecken müssen, sondern nur oder verstärkt, wenn Gefahr droht. Außerdem verringern Variationen im Phänotyp der Pflanze das Risiko, dass sich Feinde an die Verteidigungsstrategien der Pflanze anpassen. So steigt bei Tabakpflanzen (*Nicotiana sylvestris*) die Nikotinkonzentration, wenn sie von herbivoren Insekten befallen werden ¹³. Eine besonders interessante Form der chemischen Abwehr ist die indirekte Verteidigung, bei der Pflanzen die natürlichen Feinde der herbivoren Insekten zu Hilfe rufen. Eine Methode, Feinde der Herbivoren anzulocken, ist die Sekretion extrafloralen Nektars. Dieser Nektar, welcher keine Funktion bei der Bestäubung hat, besteht aus Wasser, Zuckern (Saccharose, Glukose, Fruktose) und Aminosäuren ¹⁴. Die Sekretion extrafloralen Nektars kann ebenfalls konstitutiv erfolgen ¹⁵ oder induzierbar sein, was erstmalig bei *Macaranga*-Bäumen beobachtet wurde ¹⁶. Dies ist ein weit verbreitetes Phänomen, welches inzwischen bei zahlreichen Pflanzenfamilien beschrieben wurde. Beispiele sind die Limabohne (*Phaseolus lunatus*) ¹⁷ und Baumwolle (*Gossypium herbaceum*) ¹⁸. Die meisten Studien konzentrieren sich auf Ameisen als Fraßfeinde der Herbivoren, wobei auch andere Raubinsekten durch den Nektar angelockt werden ¹⁹. Eine andere Methode von Pflanzen, Feinde herbivorer Insekten anzulocken, ist die Emission von Duftstoffen. Der Duft besteht zumeist aus einem komplexen Gemisch, deren Zusammensetzung von der Pflanze, vom Grad der Beschädigung und der Art des Herbivors abhängig ist. So unterscheiden sich beispielsweise die Duftprofile des Klees *Medicago truncatula* deutlich voneinander, je nachdem ob Larven der Baumwolleneule (*Spodoptera littoralis*) oder Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) an ihr fressen ²⁰. Duftstoffe lassen sich in drei Klassen einteilen: Terpene, Acetogenine und

aromatische Verbindungen (Abbildung 1) ²¹. Während die Synthese von Sesquiterpenen (z. B. β -Caryophyllen, (*E*)-Nerolidol) über den Mevalonatweg im Zytoplasma abläuft, werden Mono- und Diterpene (z. B. Linalool, (*E*)- β -Ocimen und Geranyl-linalool), über die Zwischenstufe Desoxyxylosephosphat in den Chloroplasten gebildet. Acetogenine sind fettsäureabgeleitete Verbindungen (z. B. Hexenylacetat), dagegen stammen aromatische Verbindungen (z. B. Indol, Methylsalicylat) aus dem Stoffwechsel aromatischer Aminosäuren, also dem Shikimisäureweg.

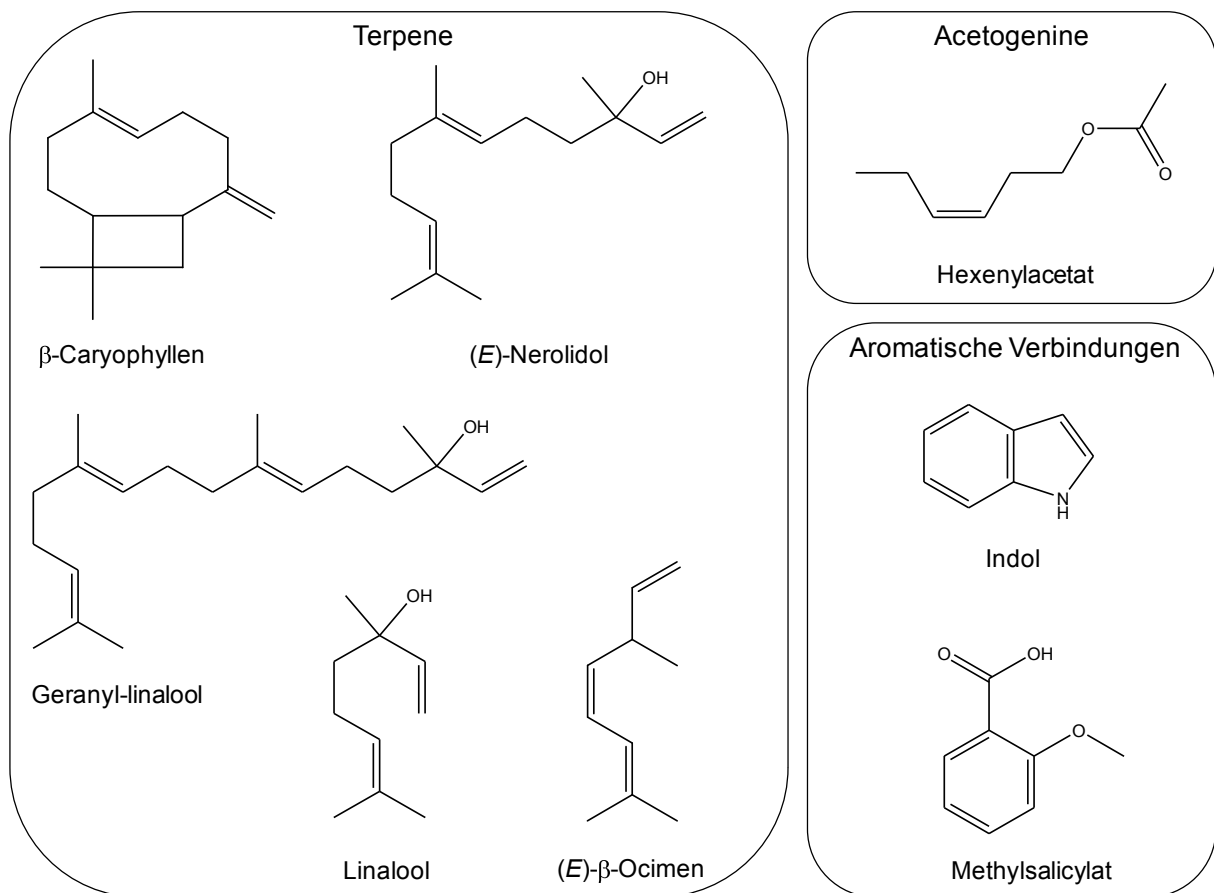


Abbildung 1. Duftstoffe werden in drei Klassen eingeteilt. **(A)** Terpene: Sesquiterpene (β -Caryophyllen, (*E*)-Nerolidol), Monoterpene (Linalool, (*E*)- β -Ocimen), Diterpene (Geranyl-linalool); **(B)** Acetogenine (Hexenylacetat); **(C)** Aromatische Verbindungen (Indol, Methylsalicylat).

Inzwischen gibt es zahlreiche Beispiele für induzierbare, indirekte Verteidigung über Duftstoffe. Eines ist die Limabohne, bei der gezeigt werden konnte, dass Raubmilben (*Phytoseiulus persimilis*) bei Spinnmilbenbefall angelockt werden ²². Ein weiteres Beispiel sind Maispflanzen (*Zea mays*), die bei Raupenfraß Duftstoffe aussenden, welche parasitische Wespen (*Cotesia marginiventris*) anlocken, die ihre Eier in die Schmetterlingsraupen ablegen ²³. Die geschlüpften Larven der Wespe nutzen die Raupe als Futterquelle, wodurch diese verenden und die Pflanze nicht mehr schädigen können.

Induktion pflanzlicher Verteidigung durch N-Acylaminosäure-Konjugate

Die Induktion indirekter Verteidigungsmechanismen in Pflanzen geschieht durch den Herbivor selbst. Elizitoren aus dem Speichel oder dem Vorderdarminhalt (Regurgitat) des herbivoren Insekts gelangen beim Fraßvorgang in die Pflanze, wo sie eine Signalkaskade auslösen. Als Elizitor in Kohlpflanzen (*Brassica oleracea*) wirkt beispielsweise eine β -Glucosidase aus dem Speichel von Kohlweißlinglarven (*Pieris brassicae*)²⁴. Eine weitere Gruppe von Elizitoren ist die der N-Acylaminosäure-Konjugate. Erstmalig wurde im Regurgitat von *Spodoptera exigua*-Larven das Volicitin (N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamin (Abbildung 2) identifiziert, welches in Mais-²⁵ oder Tabakpflanzen²⁶ Duftstoffsynthese auslöst.

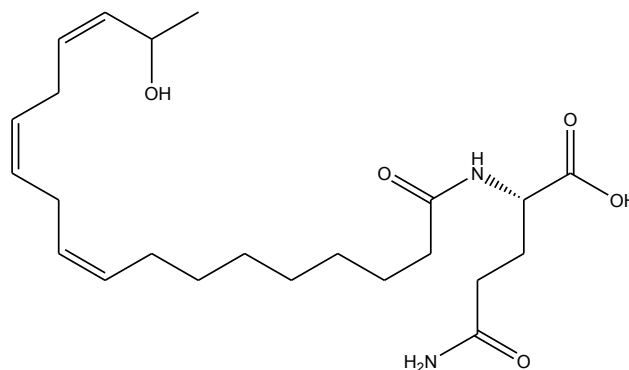


Abbildung 2. N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamin (Volicitin)

Seitdem wurden zahlreiche andere N-Acylaminosäure-Konjugate in verschiedenen Lepidoptera-Arten gefunden^{26, 27}. Dabei handelt es sich ausschließlich um N-Acylglutamine und -glutamate. Es konnte gezeigt werden, dass der sehr variable Fettsäurerest aus der Pflanzennahrung stammt, während die Aminosäure möglicherweise von der Larve synthetisiert wird^{28, 29}. N-Acylaminosäuren werden entweder durch die Vermittlung eines Rezeptors³⁰ oder möglicherweise auch direkt durch die Einlagerung in die Zellmembran²¹ von der Pflanze erkannt. Frisst ein herbivores Insekt an einer Pflanze, kommt es zu einer Membrandepolarisation³¹ und zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom³². Anschließend wird eine Proteinkinase/Phosphatase-Kaskade aktiviert, welche zu einer Freisetzung von Linolensäure führt^{33, 34}. Diese wird im Octadecanoid-Syntheseweg zur Bildung des Phytohormons Jasmonsäure verwendet³⁵⁻³⁷. Die Biosynthese ist in Abbildung 3 dargestellt. Linolensäure wird in den Chloroplasten in 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure umgesetzt, welche über ein instabiles Allenoxid zu 12-Oxophytodiensäure (OPDA) zyklisiert wird. Die folgenden Schritte finden in den Peroxisomen statt. Dort entsteht nach Reduktion und dreifacher Oxidation Jasmonsäure. Neugebildete *cis*-Jasmonsäure wird über Isomerisierung in die aktive Form *trans*-Jasmonsäure überführt.

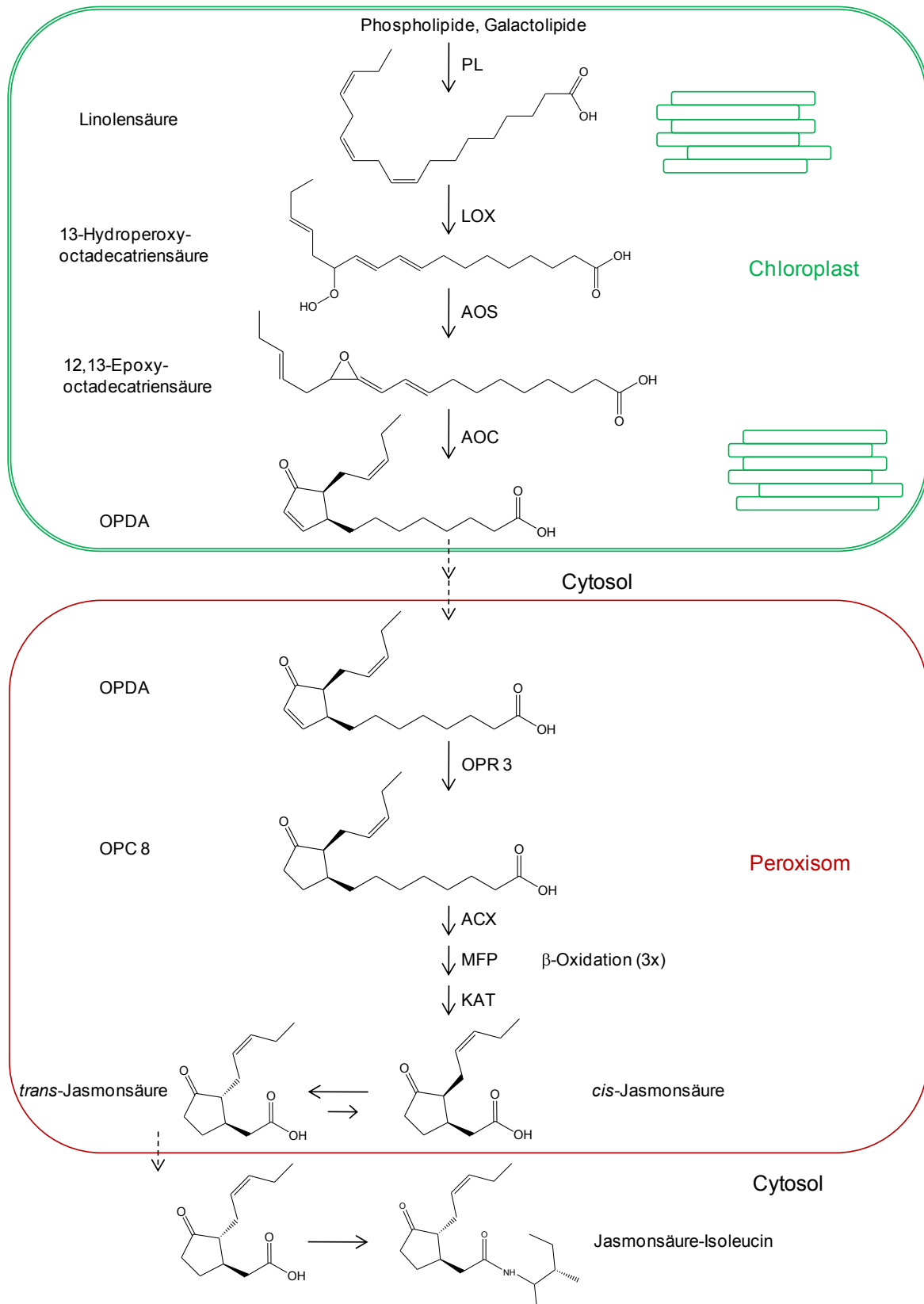


Abbildung 3. Octadecanoid-Syntheseweg. Linolensäure wird über mehrere Zwischenstufen in das Phytohormon Jasmonsäure umgewandelt. Jasmonsäure induziert unter anderem die Duftstoffsynthese in Pflanzen. PL = Phospholipase, LOX = Lipoxygenase, AOS = Allenoxyd synthase, AOC = Allenoxyd cyclase, OPDA = 12-Oxophytodiensäure, OPC 8 = 8-[(1S,2S)-3-Oxo-2-{(Z)-pent-2-enyl}cyclopentyl]octanoat, OPR 3 = 12-OPDA-Reduktase, ACX = Acyl-CoA-Oxidase, MFP = multifunctional protein, KAT = L-3-Ketoacyl-CoA-Thiolase.

Der Octadecanoid-Syntheseweg ist einer der drei wichtigsten Signalvermittlungswege in der Pflanze. Über die Jasmonsäure werden neben der Induktion von Duftstoffen zahlreiche andere Abwehrreaktionen gegen herbivore Arthropoden reguliert. Nicht nur Jasmonsäure sondern auch verschiedene Derivate, wie z. B. Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugate sind wichtige Signalmoleküle ³⁸.

Bedeutung und Herkunft von N-Acylaminosäure-Konjugaten in Lepidoptera-Larven

Die Funktion der *N*-Acylaminosäuren für die Larve konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Diese Konjugate gelten aber inzwischen als weit verbreitete Substanzen. Sie wurden nicht nur in verschiedenen Lepidoptera-Larven gefunden, sondern beispielsweise auch in Grillen (*Gryllus bimaculatus*, *Teleogryllus* sp.) ^{39 40}, Spinnen (*Tegenaria*, *Cupiennius*) ³⁹, der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) ⁴⁰ und einem Flusskrebs (*Orconecies limosus*) ³⁹. Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaft wurde schon früh vermutet, dass sie als Nahrungsemulgatoren dienen könnten ³⁹. Zudem wurde bei *Spodoptera*-Larven beobachtet, dass diese amphiphile Eigenschaft des Regurgitats auch in der Abwehr gegen Fraßfeinde eingesetzt wird. Werden *S. exigua*-Larven von Ameisen angegriffen, würgen sie ihren Vorderdarminhalt hervor. Das Regurgitat kann im Gegensatz zu Wasser die Antennen der Ameisen benetzen, diese beginnen sich sofort zu putzen und lassen von der Larve ab ⁴¹. Als weitere Funktion wird vermutet, dass *N*-Acylglutamine durch die Bindung und Speicherung von Glutamin den Stickstoffmetabolismus verbessern ²⁹. Auch die Herkunft der *N*-Acylaminosäuren ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass Membranproteine aus dem Darm von *Manduca sexta*- ⁴² und *S. littoralis*-Larven ⁴³ *N*-Acylglutamine bilden können. Andere Untersuchungen mit *S. littoralis* gaben Hinweise auf eine konjugationsaktive β -Glucosidase und deuten an, dass es möglicherweise mehrere verschiedene Konjugationsenzyme gibt (Rita Büchler, persönliche Mitteilung). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass zahlreiche Bakterien aus dem Darm von *S. exigua* *N*-Acylaminosäuren bilden ¹. Wird Regurgitat mit einer Fettsäure und Aminosäure versetzt, kommt es zur Konjugatbildung ⁴⁴ (Abbildung 4). In Anwesenheit von Antibiotika unterbleibt diese Reaktion. Die aus dem Darm isolierten Bakterienarten zeigen eine breite Substrattoleranz sowohl für die Fettsäure- als auch die Aminosäurekomponente ⁴⁵.

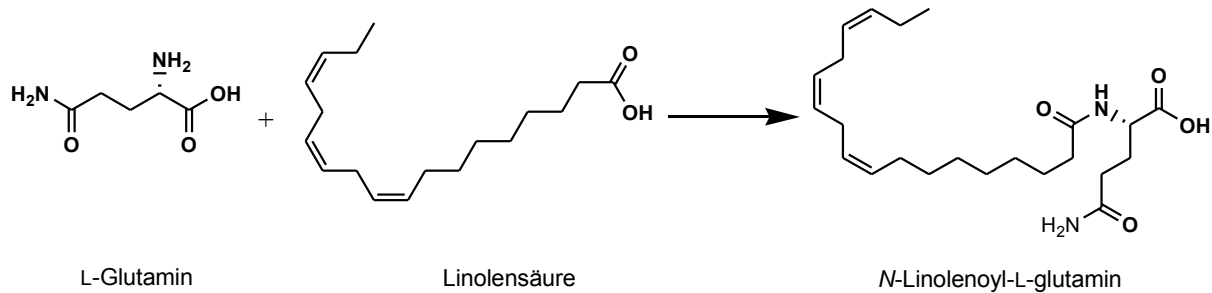


Abbildung 4. Konjugationsreaktion einer Aminosäure (L-Glutamin) mit einer Fettsäure (Linolensäure).

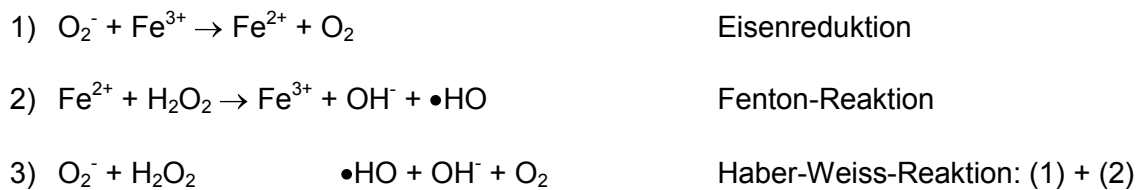
Einer der Stämme mit hoher Konjugationsaktivität ist *Microbacterium arborescens* aus der Abteilung Actinobacteria. Es handelt sich dabei um ein Bakterium mit grampositiver Zellwand und einem hohen Guanin-Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt) im Genom. Aus diesem Organismus wurde ein Enzym gereinigt, welches in der Lage ist *N*-Acylaminosäuren zu bilden ($K_M = 3 \text{ mmol l}^{-1}$) und zu hydrolisieren ($K_M = 36 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$)². Diese *N*-Acylaminosäurehydrolase (AAH) zeigt Homologien zu DPS-Proteinen (*DNA-protecting protein under starved conditions*). Wie alle DPS-Proteine besteht AAH aus zwölf Untereinheiten (je 17,181 kDa) und hat einen hohen Eisengehalt (1-16 Eisenatome je Monomer). Welche Rolle die Konjugationsaktivität dieses DPS-Proteins oder anderen bakteriellen Proteinen für das Insekt selbst oder für Insekten-Pflanzen-Interaktionen hat, ist bislang ungeklärt.

Die biologische Bedeutung von Eisen für Bakterien

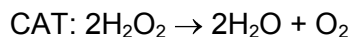
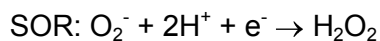
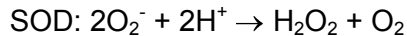
Eisen ist ein essentielles Spurenelement für fast alle Mikroorganismen. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellatmung, da es eine wichtige Komponente von Cytochromen und Eisen-Schwefel-Proteinen ist. Viele weitere Prozesse sind eisenabhängig, wie z. B. DNA-Synthese, Chemotaxis oder Methanogenese. Eisen ist ein Übergangsmetall und tritt hauptsächlich in zwei Oxidationszuständen auf: als reduziertes Fe^{2+} und als oxidiertes Fe^{3+} . Eisen ist zwar das vierthäufigste Element in der Erdkruste, die Sauerstoffanreicherung der Atmosphäre vor ca. 2,5 Milliarden Jahren führte jedoch zu einem Austausch der vorherrschenden Form. Diese wechselte von dem gut wasserlöslichen Fe^{2+} (10^{-1} M bei pH 7) zu dem nahezu wasserunlöslichen Fe^{3+} (10^{-18} M bei pH 7). Daher ist bakterielles Wachstum in vielen Ökosystemen durch das geringe Vorkommen von Eisen limitiert. Allerdings kann Eisen in Verbindung mit Sauerstoff auch sehr toxisch sein. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) interagieren mit Eisen, was zerstörerische Folgen für bestimmte Enzyme hat. Daher sind verschiedene Mechanismen notwendig, um einerseits genug Eisen aufzunehmen, aber gleichzeitig Schutz vor freiem Eisen zu erhalten.

DPS-Proteine als Schutz vor ROS

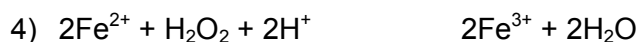
Bei der Zellatmung werden ROS, wie z. B. Hydroxid-Anionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Nebenprodukte freigesetzt. O_2^- zerstört Eisen-Schwefel-Zentren einiger Enzyme (z. B. Aconitat-Hydratase), wodurch Fe^{2+} freigesetzt wird (Gleichung 1). Dieses reagiert mit H_2O_2 , wodurch Hydroxylradikale freigesetzt werden (Gleichung 2), welche als die gefährlichsten Sauerstoffspezies gelten. Die Haber-Weiss-Reaktion wird möglich (Gleichung 3).



Um Zellen vor oxidativem Stress zu schützen, werden verschiedene Enzyme genutzt. Superoxiddismutasen (SOD) und Superoxidreduktasen (SOR) reduzieren O_2^- zu H_2O_2 . Katalasen (CAT) wandeln H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff um.



DPS-Proteine sind ebenfalls wichtige Schutzenzyme⁴⁶⁻⁴⁸. Sie gehören zur Überfamilie der eisenhaltigen Ferritine, zu denen neben den echten Ferritinen die Häm-abhängigen Bakterioferritine gehören. Während Ferritine auch in Eukaryoten vorkommen, gibt es DPS-Proteine nur in Prokaryoten. Bakterioferritine treten nur in Eubakterien auf. Ferritine und Bakterioferritine bestehen aus 24 Untereinheiten und sind ca. 500 kDa groß. Sie können 2.000-3.000 Eisenatome je Protein binden. Die kleineren DPS-Proteine bestehen im Gegensatz dazu nur aus 12 Untereinheiten, haben eine Größe von ca. 250 kDa und binden bis zu ca. 500 Eisenatome. DPS-Proteine bevorzugen H_2O_2 als Oxidans, während Ferritine und Bakterioferritine O_2 verwenden. Über die Funktion von Bakterioferritinen ist nur wenig bekannt. Ferritine sind Eisenspeicherproteine, die für Mangelzeiten Eisen aufbewahren. Die Funktion von DPS-Proteinen hingegen ist der Schutz vor oxidativem Stress. DPS-Proteine oxidieren Fe^{2+} zu Fe^{3+} , wobei das Eisen im Protein gebunden wird und reduzieren gleichzeitig H_2O_2 zu Wasser (Gleichung 4). Damit werden beide reaktiven Komponenten aus der Fenton-Reaktion (Gleichung 2) entfernt.



Daneben bieten einige DPS-Proteine physikalischen Schutz indem sie DNA binden und einen sogenannten „Biokristall“ formen. Dies ist z. B. bei *Escherichia coli*³, *Bacillus cereus*⁴⁹ und dem marinen Cyanobakterium *Trichodesmium erythraeum*⁵⁰ beschrieben. Die Regulation von DPS-Proteinen ist sehr unterschiedlich. Die meisten DPS-Proteine werden durch Stressbedingungen, wie osmotischen Stress⁵¹⁻⁵³, Temperaturschocks^{51, 53, 54}, oxidativen Stress (z. B. H_2O_2)⁵⁵⁻⁵⁷, Nährstoffmangel^{51, 53, 58} oder Ethanol^{53, 54} induziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass verschiedene DPS-Deletionsmutanten empfindlicher gegen oxidativen Stress⁵⁹⁻⁶¹, Säuren, Basen oder UV-Strahlung⁶² sind. Viele DPS-Proteine werden auch über Eisen reguliert. Deren Expression wird allerdings bei einigen durch Eisenüberschuss⁵⁶ und bei anderen durch Eisenmangel induziert^{6, 57}.

Eisenaufnahme durch Siderophore

Neben der Toxizität von Eisen ist die schlechte Verfügbarkeit im Zusammenhang mit Sauerstoff eine Schwierigkeit. Bakterien benötigen für optimales Wachstum Eisenkonzentrationen von ca. 10^{-7} M, die Löslichkeit der vorherrschenden Eisenform bei pH 7 liegt jedoch unter 10^{-18} M. Aus diesem Grund benötigen sie Mechanismen, um dieses Element besser verfügbar zu machen. Die meisten Bakterien (aber auch Pilze und Wurzeln einkeimblättriger Pflanzen) sekretieren bei Eisenmangel Siderophore. Diese niedermolekularen (< 1.000 Da) wasserlöslichen Substanzen zeichnen sich durch hohe Spezifität und Affinität gegenüber Fe^{3+} aus. Nach der Bindung an Eisen werden die Komplexe wieder in die Zelle aufgenommen. Dabei nehmen viele Bakterien auch Siderophore auf, welche sie selber nicht synthetisieren⁴⁸. Abbildung 5 zeigt den Aufnahmemechanismus. In gramnegativen Bakterien werden Siderophor-Eisen-Komplexe zunächst durch einen Rezeptor (FhuA) in der äußeren Membran erkannt und gebunden. Durch die Bindung kommt es zu Konformations-änderungen am Rezeptor und dieser kann mit dem TonB-Protein interagieren. TonB gehört zum TonB-ExbB-ExbD-Gefüge, welches mit der inneren Membran verankert ist. TonB überträgt Energie, welche durch die protonenmotorische Kraft der Cytoplasmamembran zur Verfügung gestellt wird. Dadurch kommt es erneut zu Konformationsänderungen am Rezeptor, welche zu einer Aufnahme des Eisen-Siderophor-Komplexes in das Periplasma führt^{48, 63}. Im Periplasma transportiert ein Bindeprotein (FhuD) den Eisen-Siderophor-Komplex zur inneren Membran, wo er über einen ATP-abhängigen integralen Membranapparat (FhuB-FhuC) ins Innere der Zelle transportiert wird. Grampositive Bakterien besitzen keine äußere Membran und benötigen somit kein

TonB-ExbB-ExbD-Gefüge. Sie benutzen lediglich Analoga des FhuB-FhuC-Apparates und ein FhuD-Lipoprotein, welches allerdings außen an der Cytoplasmamembran gebunden ist^{48, 64}. Nach der Aufnahme muss das gebundene Eisen im Cytoplasma freigesetzt werden. Einige Siderophore wie das Enterobactin von *E. coli* werden in der Zelle durch Esterasen hydrolysiert. In anderen Fällen wie z. B. den Ferrioxaminen wird das gebundene Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert. Durch die geringe Affinität von Fe^{2+} zum Siderophor kommt es anschließend zu einer Auflösung des Komplexes und das Siderophor kann wiederverwendet werden^{48, 65}.

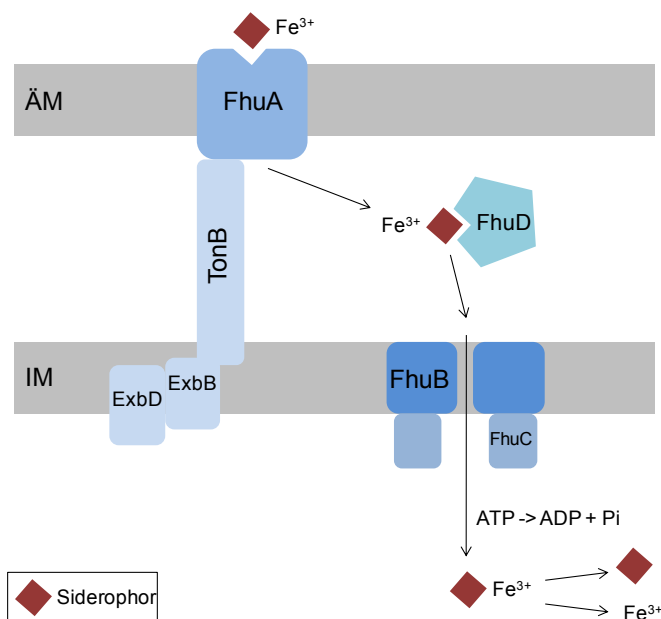


Abbildung 5. Siderophoraufnahme bei gramnegativen Bakterien. Der Siderophor-Eisen-Komplex bindet an den Rezeptor FhuA, dieser interagiert mit TonB-ExbB-ExbD. Durch Energieübertragung von TonB wird der Komplex aufgenommen. Das Bindeprotein FhuD transportiert den Komplex zur inneren Membran, wo er über die Permease FhuB und den ABC-Transporter FhuC ins Zellinnere gebracht wird. Dort kommt es schließlich zu einer Auflösung des Komplexes. (IM = innere Membran, ÄM = Äußere Membran) Abbildung verändert nach Andrews *et. al.*⁴⁸

Da Eisen bevorzugt sechsfach koordiniert wird, haben die meisten Siderophore sechs Bindungsstellen. Bei vierzähligen Siderophoren wird ein Siderophor-Eisen-Verhältnis von 3:2 benötigt um die sechszählige Koordination beizubehalten. Es herrscht eine große Vielfalt an Siderophoren, die in drei Klassen eingeteilt werden: Catecholate, Hydroxamate und Carboxylate (Abbildungen 6 und 7).

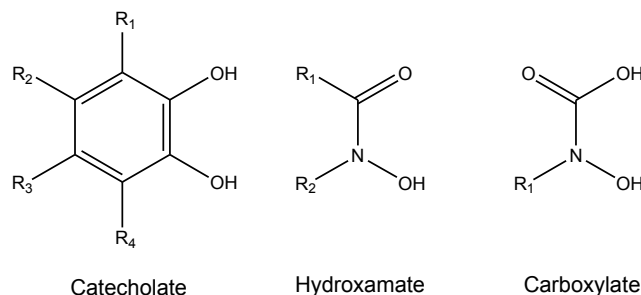


Abbildung 6. Es gibt drei Siderophor-Klassen: Catecholate, Hydroxamate und Carboxylate.

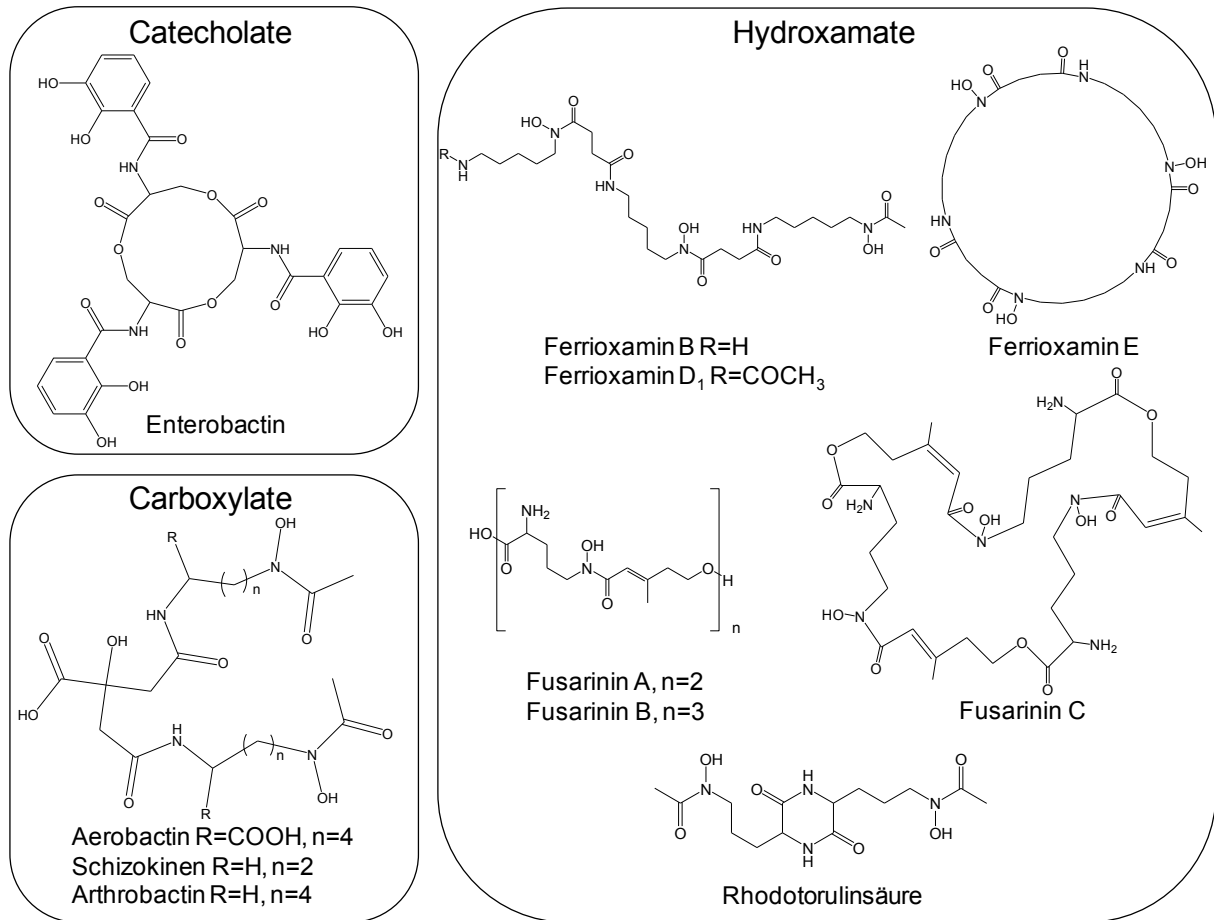


Abbildung 7. Siderophore lassen sich in drei Klassen einteilen: Catecholate, Hydroxamate (Ferrichrome, Ferrioxamine, Fusarine, Coprogene) und Carboxylate (gemischte Siderophore).

Catecholat-Siderophore werden ausnahmslos von Bakterien hergestellt. Das bekannteste Catecholat ist Enterobactin von *E. coli*. Aber auch zahlreiche andere Bakterien (z. B. *Pseudomonas aeruginosa*), welche selbst kein Enterobactin bilden, können es aufnehmen und verwerten. Hydroxamate werden sowohl von Pilzen als auch Bakterien verwendet. Zu dieser Siderophor-Klasse gehören Ferrichrome, Ferrioxamine, Fusarine und Coprogene. Ferrichrome sind eine der verbreitetsten Gruppen und werden vor allem von Pilzen synthetisiert. Ferrioxamine aus Actinomyceten (z. B. *Streptomyces* sp.) können eine lineare oder zyklische Struktur haben. Während Ferrioxamin B und D₁ linear sind, ist Ferrioxamin E ein zyklisches Trihydroxamat. Eisenfreies Ferrioxamin B (Deferioxaminmesylat, Desferal®) wird inzwischen auch zur Behandlung von Patienten mit bluttransfusionsbedingter Eisenüberladung eingesetzt. Fusarine können ebenfalls linear oder zyklisch vorliegen. Die linearen Fusarinine A und B aus *Fusarium roseum* sind vermutlich Abbauprodukte des zyklischen Fusarinin C. Coprogene können als Dihydroxamat oder Trihydroxamat vorliegen. Ein Beispiel für ein Dihydroxamat, d.h. für ein vierzähntiges Siderophor ist die Rhodotorulinsäure aus *Rhodotorula pilimanae*. Carboxylate treten meist in einer Kombination der bereits beschriebenen Klassen auf, weswegen sie auch als gemischte Siderophore

bezeichnet werden. Beispiele für diese sehr große Gruppe sind Aerobactin aus *Aerobacter aerogenes*, Schizokinen aus *Bacillus megaterium* oder Arthrobactin aus *Arthrobacter* sp.⁶⁶.

Neben der Aufnahme von Fe^{3+} über Siderophore und das TonB-ExbB-ExbD-Gefüge spielt auch die Fe^{2+} -Aufnahme eine Rolle. Dies ist vor allem unter anaeroben Bedingungen der Fall, wenn Eisen zum größten Teil als Fe^{2+} in der Umgebung vorliegt. Von dem dafür zuständigen FeoABC-System (in *E. coli*) ist wenig bekannt. Es wird angenommen, dass Fe^{2+} zunächst unspezifisch durch die äußere Membran ins Periplasma aufgenommen wird. An der inneren Membran ist das Hauptprotein FeoB gebunden, welches Fe^{2+} über einen aktiven ATP/GTP-abhängigen Prozess ins Cytoplasma transportiert^{48, 67}. FeoA und FeoC zeigen geringe Homologien zu transkriptionellen Regulatoren. FeoA hat dabei möglicherweise eine aktivierende Funktion auf FeoB. Mutationsexperimente konnten zeigen, dass *E. coli* und *Salmonella* sp. ohne dieses System deutlich schlechter den anoxischen Intestinaltrakt von Mäusen besiedeln konnten^{68, 69}.

Kontrolle der Genexpression durch Eisen

Der Eisenmetabolismus von Bakterien wird in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit des Eisens reguliert. Dies gilt z. B. für die Synthese und den Transport von Siderophoren, welche unter eisenreichen Bedingungen gehemmt und bei Eisenmangel induziert werden. Dies ist notwendig, um sowohl die schlechte Verfügbarkeit als auch die potentielle Toxizität des Eisens zu koordinieren. In *E. coli* und vielen anderen Bakterien findet diese Regulation über den transkriptionellen Repressor Fur (*ferric uptake regulator*) statt^{48, 70, 71}. Fur ist ein Homodimer, das aus 17 kDa großen Untereinheiten besteht. Jede Untereinheit besitzt zwei Metallbindestellen von denen eine durch Zn^{2+} besetzt ist. An die zweite Bindestelle bindet Fe^{2+} , welches regulatorische Funktion besitzt. Unter eisenreichen Bedingungen kommt es zu einer Bindung von Fur mit dem Co-Repressor Fe^{2+} , was die DNA-Bindeaffinität von Fur stark vergrößert. Fur ist nun in der Lage, an spezielle DNA-Abschnitte (Fur-Box) am Promotor bestimmter Gene zu binden und deren Transkription zu hemmen. Umgekehrt kommt es in Abwesenheit von Eisen zu einer Lösung des Repressors von der DNA und die Transkription kann erfolgen. Die Fur-Konzentration hängt von der Wachstumsphase ab. Die Kopienzahl steigt von 5.000 Kopien pro Zelle in der exponentiellen Phase, auf 10.000 Kopien pro Zelle in der stationären Phase an. Außerdem konnte festgestellt werden, dass oxidativer Stress zu einem Anstieg der Fur-Konzentration führt. Wahrscheinlich wird damit die Fe^{2+} -Konzentration in der Zelle reduziert, was wiederum der bereits beschriebenen Eisentoxizität vorbeugt. Die meisten Gene, welche durch Fur reguliert werden, kodieren für das Eisenaufnahmesystem,

wie die Synthese und den Transport von Siderophoren. Es gibt allerdings auch zahlreiche Fur-regulierte Gene, welche für Proteine kodieren, deren Funktionen beispielsweise in der Atmungskette, Chemotaxis, Zitronensäurezyklus, Glykolyse oder DNA-Synthese liegt. Neben der bereits beschriebenen negativen Regulation durch Fur- Fe^{2+} gibt es auch Gene, welche durch Eisen *induziert* werden. Diese Gene besitzen allerdings keine Fur-Box und werden daher nur indirekt über Fur reguliert. Dies geschieht durch RhyB, eine kleine regulatorische RNA, die durch Fur reguliert wird. Unter eisenarmen Bedingungen wird diese regulatorische RNA gebildet, welche dann ihrerseits bestimmte Gene hemmt. In Anwesenheit von Fe^{2+} wird *rhyB* hingegen nicht abgelesen und ihre regulierten Gene können somit transkribiert werden. Dazu gehören z. B. *sodB* (eisenhaltige Superoxiddismutase), *acnA* (Aconitase) oder *bfr* und *ftn* (zwei Ferritine). Dies ermöglicht, dass unter Eisenmangel die Bildung eisenverbrauchender Proteine gehemmt wird. Dadurch steht essentiellen Prozessen, wie der DNA-Synthese, genug Eisen zur Verfügung. Fur-ähnliche Proteine konnten bislang in vielen grampositiven und auch einigen gramnegativen Bakterien nachgewiesen werden. Grampositive Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt (z. B. *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*) besitzen allerdings DtxR (*diphtheria toxin regulator*), ein funktionelles Homolog zu Fur. Dieses Protein zeigt zu Fur keinerlei Sequenzähnlichkeiten, allerdings gewisse strukturelle Gemeinsamkeiten. DtxR ist wie Fur ein Fe^{2+} -abhängiger Repressor, welcher unter anderem die Eisenaufnahme reguliert. Einige Organismen wie *Mycobacterium tuberculosis* haben sowohl Fur- als auch DtxR-ähnliche Proteine ^{72, 73}.

Eisenmetabolismus in Insekten

Auch Insekten müssen die beiden gegensätzlichen Eigenschaften von Eisen, essentielles Element und potentiell Toxin, koordinieren ^{74, 75}. Eisen muss zunächst aus der Nahrung durch die Darmzellen aufgenommen werden, um von dort in die Hämolymphe transportiert zu werden. Dort wird es entweder gespeichert oder zu anderen Zellen gebracht. In Insekten sind bislang vor allem Ferritine, Transferrine und Metalltransporter nachgewiesen worden. Wie bereits erwähnt, sind Ferritine Eisenspeicherproteine, welche meist in der Vakuole gespeichert werden und bei Bedarf über den Golgi-Apparat sekretiert werden können. Das Ferritin der Hämolymphe wird im Fettkörper gebildet und dient als Eisenspeicher. Auch im Darm werden große Menge Ferritin gespeichert, welche helfen, durch Sekretion überschüssiges Eisen auszuschleusen.

Transferrine sind 80 kDa große Eisenbindepoteine mit einer Bindestelle für Fe^{3+} . Ähnlich wie in Vertebraten dienen sie dem Transport von Eisen ins Gewebe aber haben möglicherweise auch antibiotische Wirkung. Lactoferrin und Ovotransferrin in Milch bzw.

Eiern halten die Konzentration des verfügbaren Eisens niedrig, um das Wachstum von Pathogenen zu hemmen (Eisenrückhaltestrategie). Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus auch in Insekten vorkommt.

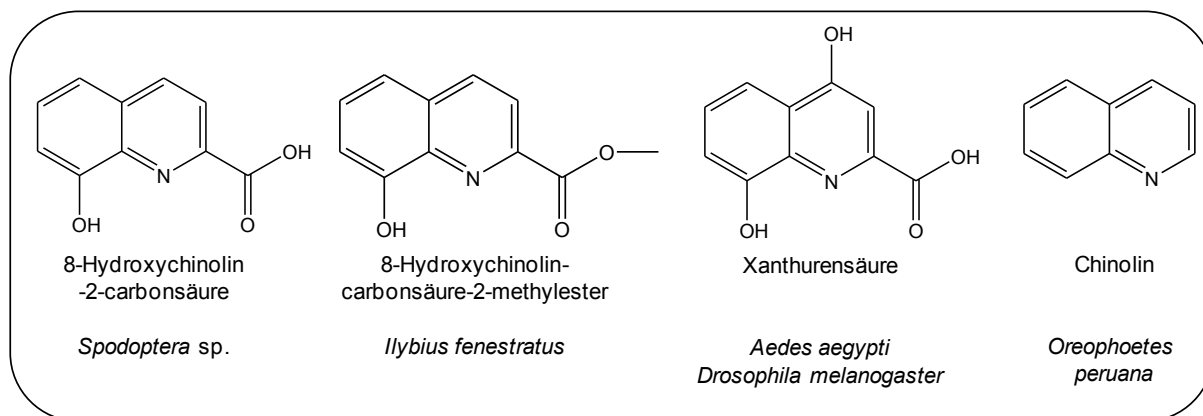
Die Eisenaufnahme wird über Metalltransporter reguliert. Von Säugetieren ist bekannt, dass Eisenregulatorproteine die Translation von Ferritinen und Transferrin-Rezeptoren regulieren. Ist nur wenig Eisen vorhanden, wird weniger Ferritin gebildet, aber die Transferrin-Rezeptoren werden vermehrt synthetisiert. Das Gegenteil passiert bei Eisenüberschuss. Bei Insekten ist eine solche translationale Kontrolle bislang für Ferritine und ein bestimmtes Eisenschwefelprotein (Succinatdehydrogenase) bekannt. Ferritin wird in Insekten ebenfalls auf transkriptionaler Ebene über z. B. Eisen reguliert.

8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure – ein Chinolinderivat aus dem Regurgitat von Lepidoptera-Larven

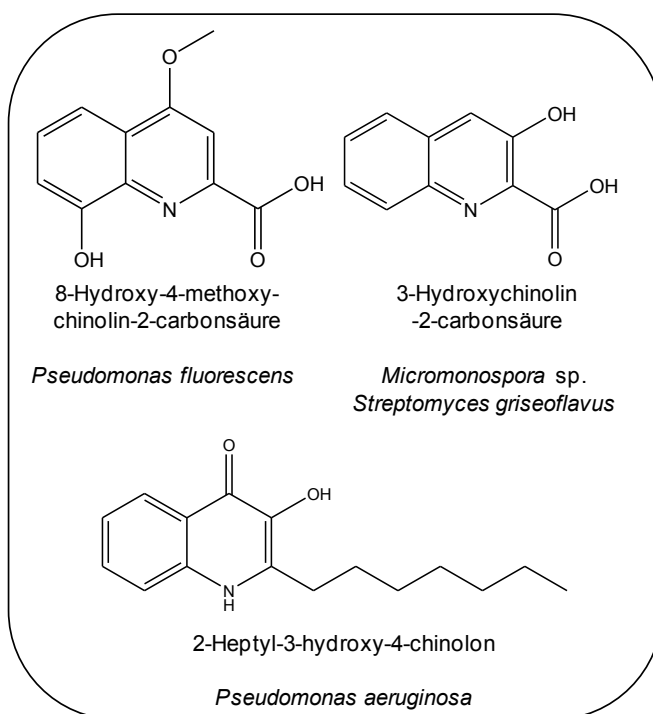
Neben den beschriebenen *N*-Acylaminosäuren gibt es eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen im Regurgitat von *Spodoptera*-Larven. Eine Substanz, welche dort in besonders hoher Konzentration vorliegt, ist die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (8-HQA) ⁴⁵. Aus der Literatur sind verschiedene Chinolinderivate aus unterschiedlichen Organismen bekannt. Einige Beispiele sind in Abbildung 8 dargestellt. Chinolinderivate finden sich sowohl in Insekten als auch in Bakterien und Pflanzen. Im Wehrsekret des Schwimmkäfers *Ilybius fenestratus* stößt man auf den 8-Hydroxychinolincarbonsäure-2-methylester ⁷⁶. In *D. melanogaster* ^{77, 78} und verschiedenen Stechmückenarten ^{7, 79} konnte die Xanthurensäure nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese die Gametogenese des Malaria-Erregers *Plasmodium* in *Anopheles stephensi* induziert ⁷⁹. Im Wehrsekret der Gespenstschrecke *Oreophoetes peruana* wurde außerdem der abschreckende Stoff Chinolin identifiziert ⁸⁰. Doch auch in Bakterien sind Chinolinderivate keine Seltenheit. In *Pseudomonas fluorescens* konnte die 8-Hydroxy-4-methoxychinaldinsäure (Quinolobactin) beispielsweise als Siderophor nachgewiesen werden ⁸¹. *Pseudomonas aeruginosa* besitzt zudem ein Quorum-Sensing-Signalmolekül (2-Heptyl-3-hydroxy-4-chinolon), welches ein Chinolinderivat besitzt ⁸². Die 3-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (3-HQA) aus *Streptomyces griseoflavus* ist hingegen wahrscheinlich eine Vorstufe des Antibiotikums Cinropeptin ^{83, 84}. 3-HQA ist außerdem Vorläufer der antitumoral-wirkenden Komponente Thiocoralin, welche aus dem marinen Actinomycet *Micromonospora* sp. isoliert wurde ⁸⁵. Auch aus dem Schwamm *Dendrilla membranosa* konnte ein antimikrobiell wirkendes Chinolinderivat, die 4,5,8-Trihydroxychinolin-2-carbonsäure, isoliert werden ⁸⁶. Untersuchungen an 8-Hydroxychinolinderivaten zeigten ebenfalls bakteriostatische und

fungistatische Wirkung, die mit dem Chelatbildungsvermögen und der Lipidlöslichkeit begründet wurden^{87, 88}.

Insekten



Bakterien



Pflanzen

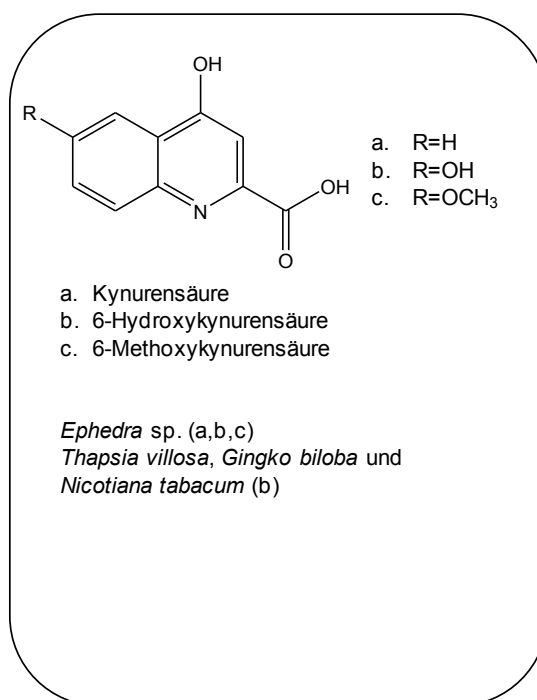


Abbildung 8. Chinolinderivate von Insekten, Bakterien und Pflanzen.

In Pflanzen konnten verschiedene Kynurensäure-Derivate nachgewiesen werden⁸⁹⁻⁹², wie z. B. die 6-Hydroxykynurensäure aus *Ginkgo biloba*⁹¹. Diesen Komponenten konnte allerdings bislang keine Funktion zugeordnet werden. Im Gehirn von Säugetieren spielt die Kynurensäure eine wichtige Rolle, da sie dem Schutz des Zentralnervensystems dient. Sie wirkt antagonistisch an ionotropen Aminosäurerezeptoren und verhindert somit eine übermäßige Stimulation durch anregende zelleigene Substanzen wie der Chinolinsäure.

Chinolinderivate können in zahlreichen Organismen nachgewiesen werden. Die Funktionen sind in vielen Fällen unterschiedlich oder unbekannt. Auch die Rolle von 8-HQA im Larvendarm ist bislang unklar. Eine mögliche Funktion könnte die Komplexbildungseigenschaft von 8-HQA sein. Es ist bekannt, dass die 8-HQA ein Chelator für verschiedene bivalente Metallionen ist⁹³⁻⁹⁶. Auch mit Eisen (Fe^{2+} und Fe^{3+}) bildet 8-HQA Komplexe aus⁹⁷. Wie die Röntgenstruktur des 8-HQA/ Fe^{2+} -Komplexes in Abbildung 9 zeigt, orientieren sich jeweils zwei Liganden um ein Eisenatom.

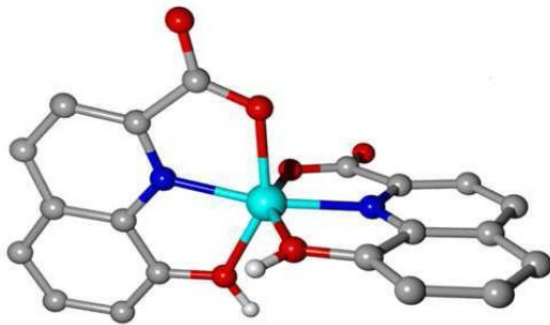


Abbildung 9. Röntgenstruktur des 8-HQA/ Fe^{2+} -Komplexes (weiß = H, grau = C, rot = O, blau = N, hellblau = Fe^{2+})⁹⁷.

Biosynthese von 8-HQA

8-HQA stammt aus dem Tryptophanmetabolismus. Wird *Spodoptera*-Larven 5-fach deuteriertes Tryptophan gefüttert, findet sich kurze Zeit später 3-fach deuterierte 8-HQA im Regurgitat wieder⁹⁷. Tryptophan ist Ausgangspunkt zahlreicher aktiver Komponenten und seine Abbauwege sind weitverzweigt⁹⁸. Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure. Doch ihr Anteil in Proteinen oder als freie Komponente ist eher gering. Da ein Überschuss an Tryptophan toxische Effekte hervorrufen kann, sind Abbauwege notwendig. In Säugetieren wird Tryptophan hauptsächlich über 3-Hydroxyanthranilat zur Bildung von Nicotinsäure und NAD verwendet. Überschüssiges Tryptophan kann vollständig in Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut werden. In Insekten ist dieser Abbauweg nicht vorhanden und andere Synthesewege spielen eine Rolle. Der Vorstufe 3-Hydroxykynurenin kommt hier eine Schlüsselfunktion zu. Anders als in Säugetieren wird 3-Hydroxykynurenin zur Bildung der Augenpigmente, der Ommochrome, verwendet. 3-Hydroxykynurenin wird leicht oxidiert, was zur Bildung von ROS führt⁹⁹. In der Stechmücke *Aedes aegypti* konnte gezeigt werden, dass das chemisch reaktive 3-Hydroxykynurenin während der Larvenentwicklung über eine Transaminase-Reaktion in die chemisch stabile Xanthurensäure überführt wird. Während des Puppenstadiums wird diese Reaktion dann herunter reguliert und 3-Hydroxykynurenin akkumuliert. Es wird in der Puppe zu den Facettenaugen transportiert und dort für die

Bildung von Augenpigmenten verwendet ⁸. Es wurde vermutet, dass die 8-HQA von der Xanthurensäure ausgehend synthetisiert wird (Abbildung 10) ⁹.

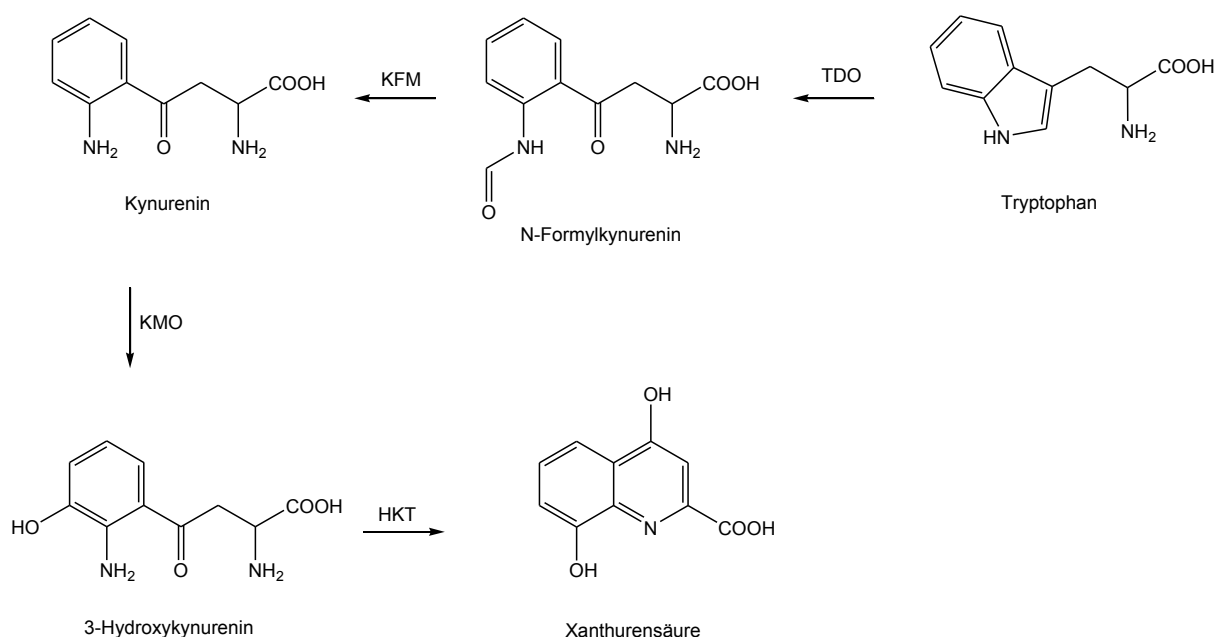


Abbildung 10. Biosynthese von Xanthurensäure in Stechmücken ⁹. TDO = Tryptophandioxygenase, KFM = Kynureninformamidase, KMO = Kynureninmonooxygenase, HKT = 3-Hydroxykynurenintransaminase.

Der abschließende biosynthetische Schritt für die 8-HQA wäre die Entfernung der 4-Hydroxylgruppe, eine ungewöhnliche enzymatische Reaktion. Doch aus *Pseudomonas* sp. und *Serratia marcescens* konnten Enzyme mit dieser Funktion isoliert werden ^{100, 101}. Außerdem wurde in Arbeiten der 1950er und -60er Jahre beschrieben, dass Ratten und Kaninchen oral aufgenommene Xanthurensäure in 8-HQA umwandeln ¹⁰²⁻¹⁰⁵. Diese Reaktion wurde gastrointestinalen Bakterien zugeschrieben.

Anhand von Gencluster-Analysen wurde die Synthese der bereits genannten 3-HQA in *Micromonospora* sp. gezeigt ⁸⁵ (Abbildung 11). Auch in diesem Syntheseweg wird zunächst die 4-Hydroxylgruppe der Kynurensäure entfernt und anschließend eine 3-Hydroxylgruppe hinzugefügt. Würde die 8-HQA auf diese Weise synthetisiert werden, wäre der letzte Schritt eine 8-Hydroxylierung der Chinaldinsäure.

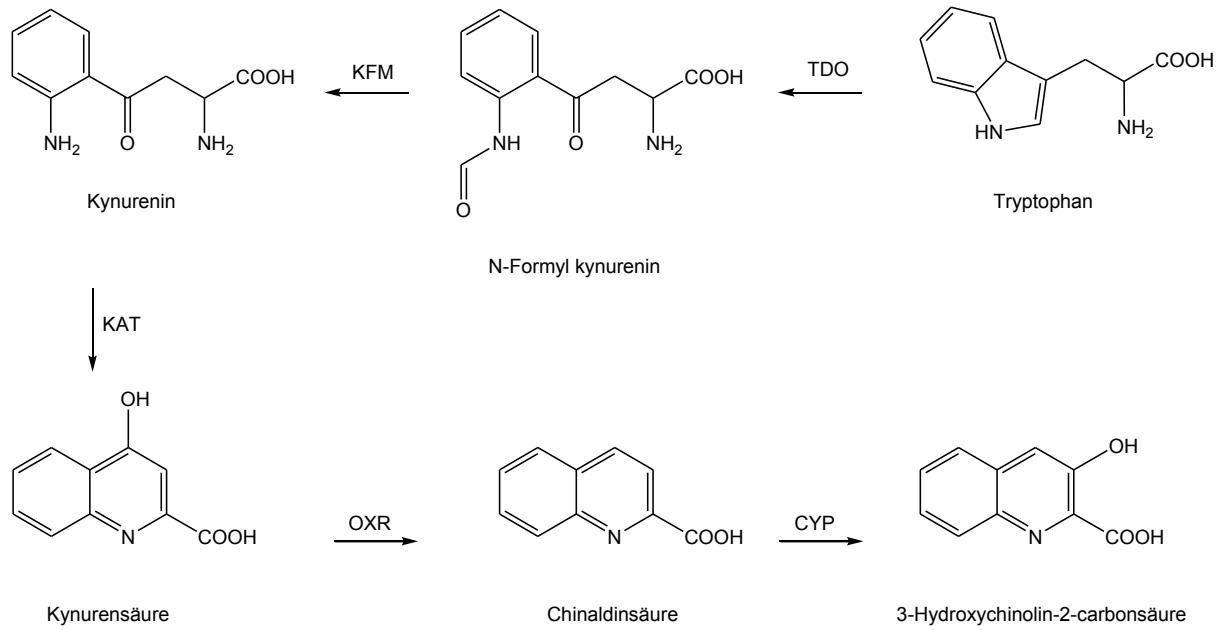


Abbildung 11. Biosynthese von 3-Hydroxychinolin-2-carbonsäure in *Micromonospora* sp.⁸⁵. TDO = Tryptophan-dioxygenase, KFM = Kynureninformamidase, KAT = Kynureninaminotransferase, OXR = Oxidoreductase, CYP = Cytochrom P450

Aufgabenstellung

N-Acylaminosäuren spielen eine bedeutende Rolle in Insekten-Pflanzen-Interaktionen. Gelangen diese Aminosäure-Fettsäure-Konjugate mit dem Speichel des herbivoren Insekts in das Blatt mancher Pflanzen, wird in dieser Pflanze eine Signalkaskade ausgelöst, welche zur Emission von Duftstoffen führt. Diese Duftstoffe locken Fraßfeinde oder Parasiten der herbivoren Insekten an und dienen somit der indirekten Verteidigung der Pflanze. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass auch Darmbakterien von *S. exigua*-Larven in der Lage sind, *N*-Acylaminosäuren zu produzieren, sogenannte Konjugationsaktivität besitzen. Bakterien könnten möglicherweise eine zusätzliche trophische Ebene in der indirekten Verteidigung von Pflanzen darstellen ¹. Aus *M. arborescens* konnte bereits das Enzym AAH isoliert werden, welches *N*-Acylaminosäuren herstellen und hydrolysieren vermag ². Ziel dieser Arbeit sollte es sein herauszufinden, ob andere Darmbakterien ebenfalls AAH oder ein ähnliches Enzym besitzen oder ob möglicherweise unterschiedliche Proteine *N*-Acylaminosäuren produzieren können. Die aus *M. arborescens* isolierte konjugationsaktive AAH zeigt Homologien zu DPS-Proteinen. Diese Proteine schützen die DNA sowohl durch ihre Fähigkeit Eisen zu binden als auch dadurch, H₂O₂ zu H₂O reduzieren zu können. Dadurch wird die Fenton-Reaktion und somit die Bildung von Hydroxylradikalen verhindert. Viele DPS-Proteine werden in der stationären Wachstumsphase und unter bestimmten Stressbedingungen induziert. Die genaue Regulation ist bei verschiedenen Arten jedoch sehr unterschiedlich. In dieser Arbeit sollten Regulation und Funktion von AAH in *M. arborescens* Se 14 untersucht werden.

Neben den beschriebenen *N*-Acylaminosäuren gibt es weitere biologisch aktive Substanzen im Regurgitat von *Spodoptera*-Larven. Eine Komponente, welche in besonders hoher Konzentration vorliegt, ist die 8-Hydroxychinolin-2-carbonäure ⁴⁵. Da Chinolinsäurederivate von Organismen verschiedener phylogenetischer Gruppen gebildet werden, sollte zunächst geklärt werden, ob 8-HQA tatsächlich von der Larve selbst gebildet wird oder von ihren Darmbakterien. Welche Rolle die 8-HQA in der Larve spielt, ist bislang unklar, da strukturell ähnlichen Substanzen unterschiedliche Aufgaben zugeordnet wurden. Die 8-HQA komplexiert Eisen und in *P. fluorescens* wurde ein Chinolinsäure-Siderophor identifiziert ⁸¹. Bei Insekten gibt es für Chinolinderivate Hinweise auf eine Abschreckfunktion ^{76, 80, 106, 107}. In Stechmücken wurde allerdings gezeigt, dass die Funktion der sehr ähnlichen Xanthurensäure die Entfernung einer potentiell giftigen Vorstufe des Tryptophan-metabolismus ist ^{7, 9}. Eine wichtige Aufgabe war es, mehr über den möglichen Zweck der 8-HQA in der Larve zu erfahren. Nicht zuletzt war ein weiteres wichtiges Ziel, den Biosyntheseweg der 8-HQA aufzuklären.

Material und Methoden

Allgemeines

Hersteller

Wenn nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien, Puffer- und Medienbestandteile und Verbrauchsmaterial von den Firmen Carl Roth oder Sigma-Aldrich bestellt.

Puffer

Als Puffer wurden vor allem Tris-HCl-Puffer eingesetzt. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) wurde in Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure (HCl) auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

Außerdem kamen Natriumphosphatpuffer zum Einsatz. Dazu wurden Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat jeweils als 0,2 M Stammlösungen in Wasser hergestellt. Durch unterschiedliche Mischverhältnisse der beiden Lösungen wurden Puffer verschiedener pH-Werte hergestellt.

Mikrobiologie

Kultivierung von Bakterien und Pilzen

Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte meist bei 28°C oder 37°C (Tabelle 1) in einem Certomat® BS-1-Schüttler. Kulturen auf festem Medium in Petrischalen wurde in Heraeus-Brutschränken inkubiert. Für Flüssigkulturen wurde BHI- (*brain heart infusion*) oder LB-Medium (*lysogeny broth*) verwendet (Tabelle 1). Als feste Nährmedien wurden LB oder SFM (*soy flour mannitol*) verwendet. Flüssiges LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid (NaCl) auf 1 l entionisiertes Wasser. Festes LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar auf 1 l entionisiertes Wasser. Festes SFM-Medium: 20 g Mannit, 20 g Sojamehl, 15 g Agar auf 1 l entionisiertes Wasser. Transfomierte *E. coli*-Stämme mit pET-Plasmid wurden in antibiotikahaltigem (30 µg/ml Kanamycin) LB-Medium kultiviert. Die Zelldichte (OD₆₀₀) wurde in einem Eppendorf® BioPhotometer® bei 600 nm bestimmt.

Pilz- und Bakterienstämme

Tabelle 1. Verwendete Bakterienstämme und deren Herkunft. Zusätzlich sind die Kultivierungstemperatur und das verwendete Wachstumsmedium angegeben.

Name	Herkunft	Temperatur	Medium
<i>Klebsiella</i> sp. Se 4	Isolate aus dem Darm von <i>Spodoptera exigua</i> ⁴⁵	37°C	BHI
<i>Staphylococcus aureus</i> Se 8		37°C	BHI
<i>Ochrobactrum</i> sp. Se 9		37°C	BHI
<i>Enterococcus mundtii</i> Se 12		37°C	BHI/LB
<i>Microbacterium arborescens</i> Se 14		37°C	BHI/LB
<i>Enterobacter cloacae</i> Se 17		37°C	BHI
<i>Leucobacter komagatae</i> Se 18		37°C	BHI/LB
<i>Arthrobacter nicotianae</i> Se 35		37°C	BHI/LB
<i>Enterococcus rottae</i> Se 51		37°C	BHI
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Se 59		37°C	BHI
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> Se 69		37°C	BHI
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	DSMZ* (Nr. 20123)	28°C	BHI/LB
<i>Arthrobacter aureus</i>	DSMZ* (Nr. 20116)	28°C	BHI
<i>Bacillus thuringiensis</i>	DSMZ* (Nr. 2046)	28°C	LB
<i>Enterococcus mundtii</i>	DSMZ* (Nr. 4838)	37°C	BHI/LB
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	DSMZ* (Nr. 28)	28°C	LB
<i>Microbacterium arborescens</i>	DSMZ* (Nr. 20754)	28°C	BHI/LB
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSMZ* (Nr. 43066)	28°C	BHI
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSMZ* (Nr. 43205)	28°C	BHI
<i>Serratia entomophila</i>	DSMZ* (Nr. 12358)	28°C	LB
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	DSMZ* (Nr. 3370)	28°C	LB
<i>Escherichia coli</i> NEB5-alpha	New England Biolabs (NEB)	37°C	LB
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Stratagene	37°C	LB
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen	37°C	LB
<i>E. coli</i> Origami TM 2 (DE3)	Novagen	37°C	LB
<i>E. coli</i> Rosetta TM	Novagen	37°C	LB

*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

Die in dieser Arbeit verwendeten Pilz- und Bakterienstämme sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet. Die Se-Stämme wurden von Prof. Dr. Konrad Dettner (Universität Bayreuth) zur Verfügung gestellt und anschließend mittels 16S-rDNA-PCR erneut auf ihre Identität geprüft. Bakterien- und Pilzstämme wurden in 12,5% (v/v) Glycerin in Nährmedium bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 2. Verwendete Pilzstämmen und deren Herkunft. Zusätzlich sind die Kultivierungstemperatur und das verwendete Wachstumsmedium angegeben.

Name	Herkunft	Temperatur	Medium
<i>Cordyceps militaris</i>	DSMZ* (Nr. 1153)	28°C	SFM
<i>Metarhizium anisopliae</i>	DSMZ* (Nr. 1490)	28°C	SFM
<i>Beauveria bassiana</i>	PRZ** (Nr. 4404)	28°C	SFM
<i>Beauveria bassiana</i>	PRZ** (Nr. 5084)	28°C	SFM
<i>Fusarium equiseti</i>	PRZ** (Nr. 5459)	28°C	SFM

*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

**Pilz-Referenz-Zentrum, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Agardiffusionstests

Um die Wirkung von 8-HQA bzw. Regurgitat auf das Wachstum von Bakterien und Pilzen auf festem Nährmedium zu untersuchen, wurden verschiedene Agardiffusionstests durchgeführt. Pilze wurden gleichmäßig auf SFM-Agar ausplattiert. In den Agar wurde in die Mitte ein Loch gestanzt und mit 70 µl 50 mM 8-HQA gefüllt. In den folgenden 5-7 Tagen wurde der Einfluss auf das Wachstum beobachtet. Um den Einfluss von Regurgitat auf Bakterienwachstum zu bestimmen, wurde eine Übernachtskultur 10^{-6} - 10^{-8} verdünnt und 50 µl auf LB-Platten (Durchmesser 5,5 cm) ausplattiert. Anschließend wurde auf eine Hälfte 100 µl sterilfiltriertes Regurgitat (Ultrafree®-MC 0,22 µm, Millipore) gestrichen und die Platten über Nacht bei der geeigneten Temperatur inkubiert.

Molekularbiologie

Allgemeine Techniken

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA wurden verschiedene Taq-Polymerasen und PCR-Programme eingesetzt (siehe: *Klonierung von gdh, puo und afp* und *16S-rDNA-Identifikation*) Die notwendigen Nukleotide wurden dabei als dNTP-Gemisch von Promega erworben. Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte durch MWG-Biotech, Martinsried. Die Amplifizierung fand in einem Eppendorf® Mastercycler® gradient statt.

Agarosegele

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen getrennt. Diese bestanden aus 1% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 20 mM Essigsäure, pH 8,5) und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Die Visualisierung erfolgte auf einer Geldokumentationsstation (BioDocAnalyze, Biometra). Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurde ein 1kb-Marker (NEB) verwendet. DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick® Gelextraktionskits (Qiagen) oder mit Ultrafree®-DA-Einheiten (Millipore) aus dem Agarosegel extrahiert und wie dort beschrieben eingesetzt.

DNA-modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen schneiden an spezifischen Stellen der DNA und können somit zur Herstellung von Plasmidkonstrukten eingesetzt werden. Alle Enzyme wurden zusammen mit ihren optimalen Puffern von NEB erworben. Die Entfernung der Restriktionsenzyme erfolgte mit Hilfe von Micropure™-EZ-Einheiten (Millipore).

T4 DNA Ligase verbindet DNA-Fragmente, beispielsweise einen Vektor mit seinem *insert*. Dieses Enzym wurde zusammen mit seinem optimalen Puffer von Fermentas oder Invitrogen erworben und jeweils wie dort beschrieben eingesetzt.

Kompetente Zellen und Transformation

Die Bakterienstämme XL-1Blue, BL21, Origami™ 2 und Rosetta™ wurden chemisch kompetent gemacht. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis vorgenommen. Eine 100 ml Kultur wurde bis OD₆₀₀ = 0,8-1 kultiviert. Die Zellen wurden mit 10 ml 0,1 M Magnesiumchlorid (MgCl₂) gewaschen und in 10 ml 0,1 M Calciumchlorid (CaCl₂) suspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert, in 1 ml 0,1 M CaCl₂, 14% (v/v) Glycerin suspendiert und in 50 µl Aliquots bei -80°C aufbewahrt. Kompetente Zellen wurden in 1 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ suspendiert und mit 1-20 µl des Ligationsansatzes versetzt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 3 min bei 37°C inkubiert und dann wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie mit 500 µl LB-Medium versetzt und 30-60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf selektiven LB-Agarplatten (30 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen, um nach positiven Transformanten zu selektieren. Zudem wurden kompetente NEB5-alpha-Zellen (NEB) gekauft. Diese besitzen eine hohe Transformationseffizienz, die für PCR-basierte Klonierungsmethoden notwendig ist.

DNA-Präparation

Die Präparation von Plasmiden aus 4 ml 15-20h-alten *E. coli*-Kulturen erfolgte mit dem QIAprep® Miniprep-Kit (Qiagen).

Die Präparationen genomischer DNA aller Bakterienstämme wurden nach Ping 2005¹⁰⁸ vorgenommen. Dazu wurden 4 ml einer 15-20 h alten Kultur zentrifugiert, der Niederschlag mit 0,1x SSC (*saline sodium citrate*: 15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumcitratdihydrat, pH 7) gewaschen und anschließend in 100 µl Lysozypuffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 20% Saccharose) suspendiert. Zu der Probe wurden 0,25 mg Lysozym gegeben und bei 55°C inkubiert. Nach 45 min wurden erneut 0,25 mg Lysozym und 100 µl Lysozypuffer hinzugefügt und für weitere 45 min inkubiert. Anschließend wurden 800 µl Zellysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 1% Natriumlaurylsulfat (SDS)), 0,15 mg Proteinase K und 0,12 mg Ribonuklease A hinzugefügt. Nach 45 min bei 55°C wurden 200 µl 5 M NaCl und 150 µl CTAB/NaCl (10% Cetyltrimethylammoniumbromid in 0,7 M NaCl) hinzugefügt und für weitere 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf ca. 37°C abgekühlt und eine Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen. Es wurde einmal mit 340 µl Phenol/Chloroform (1:1) und dreimal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Organisches Lösungsmittel wurde zur Probe gegeben, geschüttelt und 10 min zentrifugiert (15.000 g). Die wässrige Phase wurde jeweils für den nächsten Schritt weiterverwendet. Schließlich wurde die DNA mit Isopropanol (50%) und Natriumacetat (0,3 M) gefällt, mit 70%-Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser suspendiert.

Die Bestimmung der Konzentration von genomischer und Plasmid-DNA erfolgte in einem Eppendorf® BioPhotometer® bei 260 nm. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Sequenzierung

Um eine korrekte Klonierung nachzuweisen, wurden Plasmidkonstrukte oder PCR-Fragmente sequenziert (MWG-Biotech, Martinsried).

16S-rDNA-Identifikation

Zur Identifizierung der bakteriellen Isolate aus dem Darm von *S. exigua* wurden die DNA einiger Zellen als Matrize für eine PCR verwendet. Es wurden universelle Oligonukleotide (Abbildung 12) für eubakterielle 16S-rDNA eingesetzt¹⁰⁹.

27f: 5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3'

1525r: 5'-ggg tac ctt gtt acg act t-3'

Abbildung 12. Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von 16S-rDNA

Für die PCR wurde GoTaq® DNA-Polymerase (Promega) wie durch die Hersteller beschrieben verwendet. Das PCR-Programm ist in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3. PCR-Programm für die Amplifizierung von 16S-rDNA

Schritt	Zeit	Temperatur/°C	} Schritt 2-4 30x
1	2 min	95	
2	1 min	94	
3	1 min	52	
4	1,5 min	72	
5	10 min	72	
6	∞	4	

Die PCR-Fragmente wurden anschließend sequenziert und mit NCBI-Datenbanken (*National Center for Biotechnology Information*) abgeglichen.

Klonierung von *gdh*, *puo* und *afp*

Ausgehend von den verfügbaren genomischen Sequenzen (NCBI) von *Rhodococcus opacus* und *Arthrobacter aurescens* wurden Oligonukleotide (Abbildung 13) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten erstellt. Die Fragmente kodierten für eine Glutamatdehydrogenase (*gdh*, RHA1_ro01405) bzw. Putrescinoxidase (*puo*, AAur_0043).

gdh: 5'-tcc ggg aca cct gac gaa cga-3'
5'-gcg cga cca aca cca tca act act-3'
puo: 5'-tgg cat tca ttt att ggt cag c-3'
5'-acg tag cgc atg gtc gtc ctt cct-3'

Abbildung 13. Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von *gdh* bzw. *puo*-Genfragmenten

Für die PCR wurde die HotStar HiFidelity Taq DNA-Polymerase (Qiagen), inklusive Q-Solution verwendet. Das PCR-Programm ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4. PCR-Programm für die Amplifizierung der DNA-Fragmente *gdh* bzw. *puo*

Schritt	Zeit	Temperatur/°C	} Schritt 2-4 30-45x
1	5 min	95	
2	15 s	94	
3	1 min	50 (<i>gdh</i>) 57 (<i>puo</i>)	
4	2,5 min (<i>gdh</i>) 2 min (<i>puo</i>)	72	
5	10 min	72	
6	∞	4	

Die PCR-Fragmente wurden nun über UA-Klonierung nach Hersteller-Protokoll mit einem pDrive-Vector (Qiagen) ligiert und in kompetente NEB5-alpha-Zellen transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf Blau-Weiß-Selektionsagar ausplattiert (LB mit 30 µg/ml Kanamycin, 50 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), 0,2 mM 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid). Ob entstehende weiße Kolonien einen pDrive-Vektor mit PCR-Fragment (*insert*) trugen, wurde mittels PCR geprüft (Tabelle 5). Dazu wurden wenige Zellen jeder Kolonie im PCR-Ansatz suspendiert und deren DNA als Matrize verwendet (Kolonie-PCR). Der GoTaq® Master Mix (Promega) und die Oligonukleotide M13 *forward* und T7 *promoter* wurden dafür eingesetzt (Abbildung 14).

M13 *forward* (-20): 5'-gta aaa cga cgg cca gt-3'

T7 *promoter*: 5'-gta ata cga ctc act ata g-3'

Abbildung 14. Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von Vektor-*insert*

Tabelle 5. PCR-Programm für die Amplifizierung der DNA-Fragmente *gdh* bzw. *puo* aus transformierten Bakterienkolonien (Kolonie-PCR).

Schritt	Zeit	Temperatur/°C	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div> Schritt 2-4 30x </div> </div>
1	2 min	95	
2	30 s	95	
3	30 s	50 (<i>gdh</i>) 57 (<i>puo</i>)	
4	2,5 min (<i>gdh</i>) 2 min (<i>puo</i>)	72	
5	5 min	72	
6	∞	4	

Der nächste Schritt war die Klonierung in den Expressionsvektor pET28 (Novagen). Dazu wurden der pDrive-Vektor mit *insert* und der pET-Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Für die Klonierung von *gdh* wurden die Enzyme XhoI und BamHI und der Vector pET28c verwendet. Für die Klonierung von *puo* wurde EcoRI und der Vector pET28a verwendet. *Insert* und pET-Vektor wurden anschließend ligiert und in kompetente NEB5-alpha-Zellen transformiert. Zur Überprüfung von positiven Klonen wurde eine Kolonie-PCR angewendet. Im Falle von *puo* musste zudem die korrekte Orientierung des *inserts* überprüft werden, da nur eine Restriktionsschnittstelle bei der Klonierung verwendet worden war. Dazu wurden das T7 *promoter*-Oligonukleotid und ein *puo*-spezifisches Oligonukleotid eingesetzt. Von positiven Klonen wurde eine Plasmidpräparation gemacht. Die Plasmide pET28c-*gdh* und pET28a-*puo* wurden schließlich in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

Für die Klonierung von *afp* (*amide forming protein*) wurden gleiche Methoden und Materialien wie für *gdh* und *puo* eingesetzt. Der Ablauf war jedoch leicht modifiziert. Für die Amplifizierung des *afp*-Gens wurden die Oligonukleotide Abam und Ande verwendet¹⁰⁸. Diese fügen je eine Restriktionsschnittstelle an das DNA-Fragment an (Abbildung 15).

Ande: 5'-ccc atc cat atg acc gac acc aac atc-3'

Abam: 5'-agt cag gat ccg tcg gcg ccg ggt att ac-3'

Abbildung 15. Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von *afp*-Genfragmenten¹⁰⁸. Die unterstrichenen Nukleotide zeigen die eingefügten Enzymschnittstellen der Restriktionsendonukleasen NdeI (Ande) und BamHI (Abam) an.

Für die PCR wurde GoTaq® DNA-Polymerase (Promega) wie durch den Hersteller vorgeschrieben verwendet. Das PCR-Programm ist in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6. PCR-Programm für die Amplifizierung von *afp*

Schritt	Zeit	Temperatur/°C	
1	2 min	95	
2	30 s	95	} Schritt 2-4 30x
3	30 s	55	
4	34 s	72	
5	5 min	72	
6	∞	4	

Die PCR-Fragmente wurden aus dem Agarosegel extrahiert und mit NdeI und BamHI enzymatisch verdaut. Der Vektor pACYcDuet1 (Novagen) wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten. Nach dem Entfernen der Restriktionsenzyme wurden *insert* und Vektor ligiert und in chemisch kompetente XL1 Blue-Zellen transformiert. Die entstehenden Kolonien wurden über PCR auf das Vorhandensein eines *inserts* überprüft. Von einem positiven Klon wurde eine Plasmidpräparation vorgenommen. Im nächsten Schritt wurde dieses Plasmid verwendet, um ein *afp-insert* mit geeigneten Restriktionsschnittstellen zu erhalten. Aus diesem Plasmid konnte *afp* mit den Enzymen NdeI und XhoI ausgeschnitten werden. Dieses *insert* wurde anschließend mit dem gleichermaßen geschnittenen pET28b-Vektor (Novagen) ligiert und in XL1 Blue transformiert. Schließlich erfolgte eine Transformation des pET28b-*afp*-Plasmids in die Expressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3), Origami™ 2 (DE3) und Rosetta™.

Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression von heterologen Proteinen in *E. coli* wurden zunächst 3 ml LB-Medium (mit 30 µg/ml Kanamycin) angeimpft und bei 37°C bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden anschließend 100 ml Kultur angeimpft und erneut bei 37°C bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5-1,0$ kultiviert. Diese Kultur wurde geteilt und eine Hälfte mit 1 mM IPTG induziert. Ohne IPTG wird die Expression des heterologen Proteins auf dem pET-Plasmid verhindert, da es unter der Kontrolle eines LacI-regulierten Promotors steht. Der Vektor kodiert für den Repressor LacI, welcher an den Operator bindet und die Proteinexpression verhindert. IPTG bindet hingegen LacI, bewirkt eine Konformationsänderung und hebt somit seine Hemmwirkung auf. Die IPTG-induzierte und die nicht induzierte Kultur wurden anschließend für 15-20 h bei 16°C geschüttelt. Um zu prüfen, ob eine Expression stattgefunden hatte, wurden die Proteinrohextrakte der beiden Kulturen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Zur weiteren Reinigung eines heterologen Proteins konnte seine Polyhistidin-Region genutzt werden. Die Proteinreinigung erfolgte über eine HisTrapTM HP-Säule (GE Healthcare) unter Verwendung des ÄKTA-Explorers 10 (GE Healthcare). Die induzierte Kultur wurde zentrifugiert, in Bindepuffer (20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol) suspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, wie durch den Hersteller beschrieben, auf die Säule aufgetragen und über einen Gradienten mit steigender Imidazolkonzentration eluiert. Der Elutionspuffer entspricht dem Bindepuffer mit einer Imidazolkonzentration von 500 mM.

Southern Blots

Für die Southern Blot-Detektion wurde das DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) verwendet. In diesem Kit wird eine Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonde benutzt, welche anschließend über einen markierten DIG-Antikörper detektiert wird.

Für die Herstellung der DIG-markierten Sonde wurde zunächst ein PCR-Fragment des *afp*-Gens mit den Oligonukleotiden Abam und Ande hergestellt, wie oben beschrieben (*Klonierung von gdh, puo und afp*). Gereinigtes PCR-Fragment (500 ng - 3 µg in 16 µl Wasser) wurde 10 min gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Dazu wurden 4 µl der Dig-High-Prime-Lösung gegeben, welche zufällige Hexamer-Oligonukleotide, Nukleotide, DIG-dUTP und das Klenow-Enzym enthält. Das Klenow-Enzym synthetisiert nun ausgehend von den zufälligen Hexamer-Oligonukleotiden und unter Verwendung der Nukleotide (inklusive

des DIG-markierten dUTP) DNA-Fragmente variabler Länge. Das Gemisch wurde für ca. 20 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Zur erfolgreichen Anwendung der DIG-markierten Sonde ist es wichtig, die Markierungseffizienz zu bestimmen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe (3, 10, 30, 100, 300 pmol µl⁻¹) der Kontroll-DNA des Kits und der Sonde hergestellt und je 1 µl auf eine Nylonmembran (Biodyne® B Transfer Membran, Pall) getropft. Die Membran wurde für 2 min mit UV-Licht bestrahlt und dann 2 min mit 20 ml Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) äquilibriert. Die Membran wurde zunächst für 30 min mit 10 ml Blockierungslösung (im Kit als Konzentrat verfügbar) und dann 30 min mit 10 ml Antikörperlösung (bereitgestellter Antikörper 1:5.000 in Blockierungslösung) inkubiert. Der Antikörper bindet in diesem Schritt an das DIG der DNA-Sonde. Anschließend wurde die Membran zweimal für 15 min gewaschen (Maleinsäurepuffer + 0,3% (v/v) Tween® 20) und dann für 2 min mit Detektionspuffer (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,5) äquilibriert. Die Detektion erfolgte mit dem Färbesubstrat (40 µl BCIP/NBT auf 2 ml Detektionspuffer) für 5-30 min im Dunkeln. Der Antikörper ist mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt, welche die Phosphatgruppe vom BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) abspaltet. Das entstehende Produkt tautomerisiert zum Keton, welches dann zu einem blauen Indigo-Farbstoff dimerisiert. Die dabei freiwerdenden H⁺-Ionen reduzieren NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) zu einem blau-violettem Diformazan-Farbstoff. Somit kann der Antikörper und damit die Sonde auf der Membran kolorimetrisch detektiert werden. Schließlich wurde die Färbung der Kontroll-DNA und der Sonde auf der Membran verglichen und damit die tatsächliche Konzentration der Sonde abgeschätzt.

Um nun herauszufinden, ob sich das *afp*-Gen im Genom verschiedener Bakterienstämme befindet, wurde zunächst deren Gesamt-DNA nach der oben beschreibenden Methode präpariert. 7 µg der DNA wurden mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten und in einem 1%-Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetrennt. Ob die Enzymverdauung erfolgreich war, wurde auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel geprüft. Zur Depurinierung der DNA wurde das Ethidiumbromid-freie Agarosegel für 10 min in 0,25 M Salzsäure inkubiert. Anschließend folgten eine Denaturierung der DNA (zweimal 15 min 0,5 M Natriumhydroxid, 1,5 M NaCl) und eine Neutralisierung (zweimal 15 min 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl). Zur optimalen Vorbereitung auf den anschließenden Membrantransfer wurde das Gel für 10 min in 20x SSC (*saline sodium citrate*: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitratdihydrat, pH 7) äquilibriert. Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgte mit 20x SSC für ca. 20 h mit der Kapillarblot-Methode. Der Aufbau ist auf Abbildung 16 dargestellt und beschrieben.

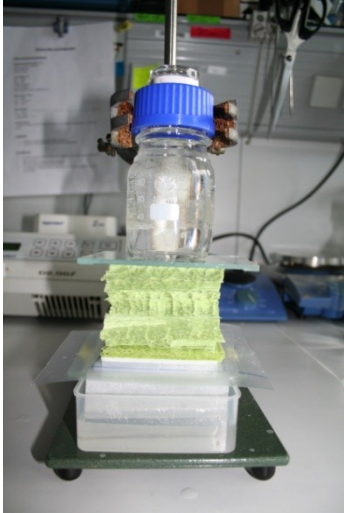


Abbildung 16. Southern Blot-Transfer. Eine Wanne wurde mit 20x SSC gefüllt und in der Mitte mit einer Glasplatte abgedeckt. Auf der Glasplatte lag dünnes Whatman®-Papier (0,18 mm), welches zu beiden Seiten der Glasplatte in die Pufferlösung eintauchte. Darauf wurde ein dickes Whatman®-Papier (1,5 mm), eine Gelmaske aus Folie (umrahmt den Stapel und verhindert, dass Puffer aus der Wanne am Gel vorbeiläuft), das Agarosegel, die Nylonmembran, ein dickes Whatman®-Papier und ein Stapel Papierhandtücher geschichtet. Der Stapel wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht (300 g) abgedeckt. Durch die Kapillarkraft wird der Puffer aus der Wanne von unten nach oben in den Papierhandtuchstapel gesogen und transportiert dabei die DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 2 min mit UV-Licht bestrahlt. Die Membran wurde zunächst mit dem vom Kit bereitgestellten Easy-Hyb für 30 min bei 50°C prähybridisiert. Die Hybridisierungs- und Waschschriffe fanden im Hybridisierungssofen (Biometra OV1) statt. 50 ng Sonde wurden 5 min gekocht, zunächst auf Eis gestellt und dann zusammen mit 2 ml Easy-Hyb zur Membran gegeben. Die Hybridisierung fand für 4-20 h bei 50°C statt. Anschließend wurde die Membran gewaschen (zweimal 5 min mit 2x SSC, 0,1% SDS bei 20°C und zweimal 15 min mit 0,5x SSC, 0,1% SDS bei 68°C). Die abschließende Detektion erfolgte ähnlich wie oben beschrieben. Die Membran wurde kurz in Waschpuffer äquilibriert und dann für 30 min in Blockierungslösung inkubiert. Die Antikörperbindung erfolgte ebenfalls für 30 min. Danach wurde die Membran für zweimal 15 min gewaschen und dann für 2 min mit Detektionspuffer äquilibriert. Die Detektion erfolgte mit dem Färbesubstrat (200 µl BCIP/NBT auf 10 ml Detektionspuffer) für 16 h im Dunkeln.

Proteinchemie

Proteinreinigung

Die Reinigung konjugationsaktiver Proteine erfolgte in zwei flüssigchromatographischen Schritten unter Verwendung des ÄKTA-Explorers 10 (GE Healthcare). *Rhodococcus erythropolis* und *Arthrobacter nicotianae* Se 35 wurden in BHI-Medium kultiviert, zentrifugiert und in Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 8) suspendiert. Die Zellen wurden für ca. 30 min mit Ultraschall aufgeschlossen und der Überstand über Anionenaustauschchromatographie über eine Resource Q 6 ml Säule (GE Healthcare) aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit einem Salzgradienten von 0,2 bis 0,5 M NaCl (Puffer B: 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl). Die entstehenden Fraktionen wurden auf ihre Konjugationsaktivität getestet und aktive

Fraktionen für die Größenausschlusschromatographie weiterverwendet. Diese erfolgte isokratisch über eine Superdex 200 pg-Säule (GE Healthcare) unter Verwendung eines SE-Puffers (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl).

Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen wurde mit Bradford-Tests bestimmt ¹¹⁰. Der Test beruht auf dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250, dessen Absorptionsmaximum bei der Bindung an die basischen Seitenketten von Aminosäuren von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. 1 µl Probenlösung wurden mit 200 µl Bradford-Reagenz (4,8% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure, 0,01% Coomassie-Brilliant-Blau G 250) versetzt und der entstehende Farbumschlag in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer (SPECTRAmax 250, Molecular Devices) bei 595 nm verfolgt. Um die Konzentration zu bestimmen, wurde eine Kalibrierkurve mit 12,5-250 ng/µl Rinderserumalbumin (BSA) zu Grunde gelegt.

Polyacrylamid-Gele

Um Proteingemische nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden Polyacrylamid (PA)-Gele verwendet. Dazu wurde das Elektrophoresesystem Mini-Protean®TetraCell von BIO-RAD eingesetzt. Die Gele werden aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 29:1 hergestellt. Es wurde eine gebrauchsfertige Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung verwendet. Die Polymerisation der beiden Substanzen wird durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und den Katalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) ausgelöst. Das Gemisch wird zwischen zwei senkrechte Glasplatten gegossen, die durch einen Abstandhalter voneinander getrennt sind. Für 1D-Gele wurde ein Abstand von 0,75 mm gewählt, für 2D-Gele ein Abstand von 1 mm. PA-Gele bestehen aus zwei Schichten. Die obere Schicht (ca. 1,5 cm), das Sammelgel, beinhaltet die Probentaschen und komprimiert die Probe um eine verbesserte Auflösung zu erhalten. Die untere Schicht, das Trenngel, ist für die Auftrennung der Probe verantwortlich. Der pH-Wert und die Polyacrylamidkonzentration bedingen die unterschiedlichen Trenneigenschaften der Schichten. PA-Gele wurden mit 0,1% Coomassie-Brilliant-Blau R250 in 30% Methanol und 10% Essigsäure in Wasser angefärbt und anschließend mit kochendem Wasser oder Entfärber (30% Methanol, 10% Essigsäure) entfärbt.

Denaturierende Gele

In dieser Arbeit wurden native und denaturierende PA-Gele verwendet. Denaturierende PA-Gele enthalten das Detergenz SDS. Dieses bildet Mizellen, welche die Proteine einhüllen und ihnen ein annähernd konstantes Ladungs- zu Masse-Verhältnis verleiht. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist somit nur noch von der Größe und nicht mehr von der Ladung abhängig. Zudem denaturiert SDS die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen, besonders nach deren vorheriger Reduktion. Die Gelpuffer des Laemmli-Systems kamen zur Anwendung ¹¹¹. Das Sammelgel bestand aus 4% Polyacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% APS, 0,1% TEMED und 0,1% SDS. Die Zusammensetzung des Trenngels war 12% Polyacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% APS, 0,1% TEMED und 0,1% SDS. Die Auftrennung von Proteinen erfolgte zunächst 10 min bei 100 V und dann ca. 50 min bei konstant 150 V. Als Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Proteine wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Ladepuffer versetzt und für 10 min im Wasserbad gekocht. Die fünffach-konzentrierte Lösung bestand aus 300 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% (v/v) Glycerin, 25% β -Mercaptoethanol, 10% SDS und 0,01% Bromphenolblau.

Native Gele

Um die physikochemischen Eigenschaften von Proteinen aufrechtzuerhalten wurden native PA-Gele verwendet. Der Nachteil dieser Gele besteht darin, dass die Proteine ihre Eigenladung behalten und während der Gelelektrophorese nicht nur nach ihrer reinen Größe aufgetrennt werden. Die Gele wurden nach dem Laemmli-System ¹¹¹ hergestellt, beinhalteten jedoch kein SDS. Auch die Proben wurden ohne SDS vorbereitet und nicht gekocht. Das Sammelgel bestand aus 4% Polyacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% APS und 0,1% TEMED. Die Zusammensetzung des Trenngels war 10% Polyacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% APS und 0,1% TEMED. Als Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet (25 mM Tris, 192 mM Glycin). Proteine wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Ladepuffer versetzt. Die fünffach-konzentrierte Lösung bestand aus 750 mM Tris-HCl pH 8,8, 50% (v/v) Glycerin und 0,01% Bromphenolblau. Die Laufbedingungen der nativen Gele entsprachen denen der denaturierenden Gele.

2D-Gelelektrophorese

Bei der 2D-Gelelektrophorese wird eine isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der denaturierenden PA-Gelelektrophorese kombiniert. Bei der IEF werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt separiert. Diese erfolgt in einem Gelstreifen, der einen immobilisierten pH-Gradienten (IPG) beinhaltet. Wird an diesen Streifen ein elektrisches Feld angelegt, durchlaufen die Proteine verschiedene pH-Bereiche. An ihrem eigenen

isoelektrischen Punkt sind sie ungeladen, und die Kraft des elektrischen Feldes kann nicht mehr auf sie wirken. 30 µg Protein wurden in 125 µl Rehydratationslösung (7 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, 2% IPG-Puffer (GE Healthcare), 0,2% Bromphenolblau, 40 mM Dithiothreitol) suspendiert und in eine Einquellschale (Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray, GE Healthcare) gegeben. Die Gelstreifen (Immobiline™ DryStrip, pH 3-11 NL, 7 cm, GE Healthcare) wurden mit der Gelseite nach unten auf die Probe gelegt und mit Mineralöl überschichtet. Das Einquellen dauerte 15-20 h. Die IEF fand in einer Multiphor II (Pharmacia Biotech) unter Verwendung eines Spannungsgradienten statt. Zunächst stieg die Spannung innerhalb von 1 min auf 200 V, anschließend innerhalb von 1,5 h auf 3500 V. Als letzter Schritt wurde die Spannung für 45 min konstant auf 3500 V gehalten. Nach der IEF wurden die Streifen in zwei Schritten mit Äquilierungspuffer (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3% (v/v) Glycerin 2% SDS und 0,2% Bromphenolblau) inkubiert. Im ersten Schritt wurden 2% Dithiothreitol zum Puffer hinzugefügt und im zweiten Schritt 2,5% Jodacetamid. Anschließend folgte die denaturierende PA-Gelelektrophorese. Das Trenngel wurde wie oben beschrieben hergestellt und der fokussierte Streifen auf die Oberkante des Gels aufgelegt. Der Streifen wurde mit 1%-Agarose überschichtet. Die Laufbedingungen der 2D-Gele entsprachen denen der 1D-Gele.

Western Blots

Zur Detektion des AAH-Proteins wurden Western Blot-Analysen gemacht. Dazu wurde die OD₆₀₀ der Bakterienkultur bestimmt, die Zellen zentrifugiert und in Ladepuffer suspendiert. Dabei wurde die Probe zu einer Zelldichte konzentriert, die einer OD₆₀₀ = 20 entsprechen würde. Wurden die verschiedenen Se-Stämme verglichen, wurden gleiche Proteinmengen verwendet. Als Positivkontrolle diente gereinigte AAH. Der Proteinextrakt wurde in einem denaturierenden PA-Gel aufgetrennt und mit dem *Semidry*-Blot-System (Hoefer SemiPhor) für 90 min bei 50 V und 50 mA auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) transferiert. Der verwendete Transferpuffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS und 20% Methanol. Um unspezifische Bindung mit den Antikörpern zu verhindern, wurde die Membran nach dem Transfer mit 1% BSA in TBS-Puffer (*tris buffered saline*: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) für 15 h bei 4°C blockiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min und zweimal 5 min gewaschen (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 0,05% (v/v) Tween®20) und schließlich 2 h mit dem AAH-Antikörper (1:300 in TBS; SeqLab) inkubiert. Danach wurde die Membran erneut gewaschen und 1 h mit dem Peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG) inkubiert (1:100.000 in TBS). Nach erneutem Waschen der Membran folgte die Detektion mit dem Elektrochemilumineszenz-

System. Dazu wurde die Membran für 1-2 min in der Detektionslösung inkubiert (100 mM Tris-HCl pH 8, 1,25 mM Luminol, 200 μ M *p*-Coumarinsäure, 0,9% H₂O₂) und anschließend in der Dunkelkammer für 30 s bis 5 min mit einem Film (CL-XPosure™ Film, Thermo Scientific) bedeckt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert mit Hilfe von H₂O₂ Luminol, was zur Lichtemission führt. *p*-Coumarinsäure dient dabei als Verstärker der Reaktion. Danach wurde der Film entwickelt und fixiert. Die Western Blots zeigten meist keinen Hintergrund und die Größe der Banden konnte mit Hilfe eines biotinilierten Proteinmarkers und einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Anti-Biotin) (Cell Signaling Technology) abgeschätzt werden.

In-Gel-Assays

In dieser Arbeit wurden verschiedene Assays eingesetzt, welche qualitativ die Aktivität von Enzymen im Gel bestimmen sollten ¹¹². Dazu wurden Proteinrohextrakte im nativen Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit der Reaktionslösung inkubiert.

Peroxidase

Der Nachweis der Peroxidaseaktivität erfolgte im Dunkeln mit 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5, 2,38 mM 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) und 0,0225% H₂O₂. AEC wurde in wenigen Tropfen Aceton vorgelöst. Bei der Umsetzung von H₂O₂ durch Peroxidasen werden Protonen frei, welche AEC zu einem rot-braunen Farbstoff oxidieren. Peroxidasen erscheinen als rot-braune Banden im Gel.

Eisen

Um zu prüfen, ob die heterolog exprimierte AAH eisenhaltig ist, wurde das native Gel mit Kaliumhexacyanoferrat(III) inkubiert (100 mM K₃[Fe(CN)₆] in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl), welches mit Fe²⁺ eine blaue Verbindung eingeht. Nach 10 min Inkubation wurde das Gel kurz mit 10% Trichloressigsäure in Methanol behandelt und anschließend mit Wasser gewaschen. Eisenhaltige Proteine erscheinen als blaue Banden im Gel.

Glutamatdehydrogenase

Die Reaktionslösung zum Nachweis der Glutamatdehydrogenase-Aktivität bestand aus 1 M Glutamat, 0,8 mM NADP, 0,37 mM NBT und 65 μ M Phenazinmethosulfat (PMS) in 125 mM Natriumphosphatpuffer pH 7. Bei der Reaktion von Glutamat zu 2-Oxoglutarat entsteht NADPH. NBT wird durch NADPH und mit Hilfe des Elektronentransporters PMS zu einem

blauen Formazan-Farbstoff reduziert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Dunkeln. Glutamatdehydrogenasen erscheinen als blau-violette Banden im Gel.

Putrescinoxidase

Die Reaktionslösung zum Nachweis der Putrescinoxidase-Aktivität bestand aus 24 mM Putrescin, 0,6 mM MgCl₂, 0,37 mM NBT und 99 µM PMS in 150 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4. Bei der Oxidation von Putrescin wird kovalent gebundenes FAD zu FADH reduziert. NBT wird durch FADH und PMS zu Formazan reduziert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Dunkeln. Putrescinoxidasen erscheinen als blau-violette Banden im Gel.

Cytochromoxidase

Das Gel wurde mit 7,3 mM *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiamine (Acros) und 10,4 mM α-Naphthol (Alfa Aesar) in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 im Dunkeln bei 37°C inkubiert. α-Naphthol wurde in wenigen Tropfen Aceton vorgelöst. Cytochromoxidasen katalysieren die NADI-Reaktion, die Verbindung der beiden Substrate zu dem blauen Farbstoff Indophenolblau. Für diesen Gelassay wurden 10 µg Gesamtprotein je Proben tasche aufgetragen. Cytochromoxidasen erscheinen als blaue Banden im Gel.

Superoxiddismutase

Die Reaktionslösung beinhaltete 0,3 mM Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium (MTT), 0,24 mM PMS und 0,92 mM MgCl in 50 mM Tris-HCl pH 8,5. Das hellgelbe MTT wird mit Hilfe von PMS zu blauem Formazan reduziert. Superoxiddismutasen hingegen katalysieren die Rückreaktion, das heißt die Oxidation zu gelben MTT. Für diesen Gelassay wurden 10 µg Gesamtprotein je Proben tasche aufgetragen. Superoxiddismutasen erscheinen als helle Banden in einem blau-violetten Gel.

Konjugationsaktivität

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Fähigkeit *N*-Acylaminosäuren herzustellen (Konjugationsaktivität), wurde Proteinextrakt mit 0,1% (v/v) Linolensäure und 13,7 mM L-Glutamin in Tris-HCl pH 8 inkubiert. Um die Se-Stämme zu vergleichen, wurden aufgeschlossene Zellen (1 ml, OD₆₀₀ = 2) in Puffer mit den Substraten versetzt. Nach 3 h bei 37°C wurde die Probe mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt und bei 4 °C zentrifugiert. Die Menge gebildeten *N*-Linolenoyl-L-glutamins im Überstand wurde über HPLC-MS quantifiziert.

Analytik und Synthesen

HPLC-MS

Als HPLC wurde ein HPLC1100-System mit binärer Pumpe (Flussrate $0,2 \text{ ml min}^{-1}$), Entgaser und Autosampler eingesetzt. Acetonitril wurde in HPLC-Qualität verwendet, Wasser wurde aus einer Quarzdestillationsanlage entnommen. Die Lösungsmittel wurden mit 0,5% Essigsäure versetzt. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HPLC-Programme und Säulen verwendet. Für die *N*-Linolenoyl-L-glutamin- und die 8-HQA-Analytik wurde eine Grom™ Sil-Säule ODS-3 CP, 120 Å, 3 µm, 125 x 2 mm (Grace) verwendet. Das entsprechende HPLC-Programm ist in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7. HPLC-Programm für die *N*-Linolenoyl-L-glutamin- und die 8-HQA-Analytik. Laufmittel A war quartzdestilliertes Wasser (0,5% Essigsäure), Laufmittel B Acetonitril (0,5% Essigsäure).

Zeit/min	Laufmittel B/%
0	0
3	0
30	100
45	100
46	0
60	0

Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin wurden über eine Ionenaustauschersäule Luna NH₂, 100 Å, 5 µm, 150 x 2 mm (Phenomenex) getrennt. Das HPLC-Programm ist in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8. HPLC-Programm für die 3-Hydroxykynurenin-Analytik. Laufmittel A war quartzdestilliertes Wasser (0,5% Essigsäure), Laufmittel B Acetonitril (0,5% Essigsäure).

Zeit/min	Laufmittel B/%
0	100
3	100
30	0
32	0
33	100
45	100

Als interne Standards wurden 5-Phenylpentanoylglutamin (Konjugationsassays) und Kynurensäure (8-HQA-Versuche) in der Konzentration 10 µg/ml eingesetzt. Zur Quantifizierung von 3-Hydroxykynurenin konnte Kynurenin (10 µg/ml) als Standard

verwendet werden, da es in den biologischen Proben nicht detektierbar war. APCI-MS-Messungen wurden mit einem Triplequadrupol-Massenspektrometer vorgenommen.

Eisenbestimmung

Die Bestimmung der Menge von Gesamteisen wurde durch Dr. Dirk Merten (Institut für Geowissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena) vorgenommen. Zur Probenvorbereitung wurden 100-200 µl Regurgitat durch eine Ultrafiltrationseinheit zentrifugiert (Vivaspin MWCO 3 kDa, Sartorius). Gemessen wurde mit ICP-MS (XSeriesII, Thermo Fisher Scientific, Bremen).

Proteomics

Proteinsequenzierungen wurden von der Abteilung für Massenspektrometrie (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie) vorgenommen. Dazu wurden zunächst die Proteine aus dem Gel ausgestochen, dann tryptisch verdaut und über MSMS-Fragmentierung *de-novo*-sequenziert. Die resultierenden Peptidsequenzen wurden einer MS-BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) -Suche unter Verwendung der UniRef100-Datenbank (UniProt Reference Clusters, European Bioinformatics Institute) unterzogen. Diese Datenbank beinhaltet 100% nicht redundante Proteinsequenzen.

Deuterierungen

Die Herstellung der deuterierten Komponenten erfolgte durch Dr. Jiří Svoboda. 8-HQA, Kynurensäure und Xanthurensäure wurden nach einer veränderten Methode von Derdau *et al.*¹¹³ deuteriert. Dazu wurden 0,4 mmol der jeweiligen Chinolinsäure, 10-15 mg Natriumborhydrid (60-85 mol %) und 17-23 mg Palladium/Aktivkohle in Deuteriumoxid suspendiert und für mehrere Tage im milden Rückfluss gekocht. Das Gemisch wurde über Celit gefiltert und das Filtrat im Vakuum abgedampft. Die Deuterierungen wurden über ¹HNMR und HPLC-MS überprüft. Bei der 8-HQA konnte eine 2-fache Deuterierung erreicht werden, wobei die Protonen 5 und 7 zu 72% bzw. 84% ausgetauscht wurden. Kynurensäure wurde an Position 3 zu 42% deuteriert. Für Xanthurensäure konnte eine 3-fache Deuterierung an den Positionen 3, 5 und 7 (22%, 61% und 47%) erreicht werden. 3-Hydroxy-DL-kynurenin wurde nach der veränderten Methode von Trachtenberg *et al.*¹¹⁴ deuteriert.

Dazu wurden 2 mg (9 µmol) in konzentriertem Deuteriumchlorid in Deuteriumoxid (600 µmol) gelöst und über Nacht in mildem Rückfluss gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde über ^1H NMR und HPLC-MS überprüft. Es konnte eine 3-fache Deuterierung erreicht werden. Die beiden enolischen Protonen der Seitenkette waren zu 100% ausgetauscht und das Proton an Position 5 im Ring zu 89%.

Aufzucht und Experimente mit Insekten

Verwendete Insekten

Die verwendeten Insekten sind in Tabelle 9 aufgelistet. Einige Tiere wurden in der freien Natur eingesammelt. Andere stammten aus langjährigen Laborpopulationen, bzw. wurden von Angelika Berg aus gelieferten Eiern angezogen.

Tabelle 9. Verwendete Insekten (Coleoptera und Lepidoptera). Die Arten sind gruppiert nach Familien. Von Lepidoptera-Arten wurden jeweils die Larven verwendet. Bei Coleoptera ist angegeben, ob Larve und/oder Adultus verwendet wurde (^LLarven, ^AAdulti).

<u>Coleoptera (Käfer)</u>	
Chrysomelidae (Blattkäfer)	
<i>Crioceris asparagi</i> ^{A*}	Gesammelt: Neustadt/Orla, Deutschland
<i>Linnaeidea aenea</i> ^L	Gesammelt: Brüssel, Belgien
<i>Plagiodera versicolora</i> ^L	Gesammelt: Brüssel, Belgien
<i>Gastrophysa viridula</i> ^{AL}	Gesammelt: Jena, Deutschland
<i>Phaedon cochleariae</i> ^{AL}	Laborpopulation
<i>Epilachna varivestis</i> ^L	Laborpopulation
Dytiscidae (Schwimmkäfer)	
<i>Agabus</i> sp. ^{A*}	Gesammelt: Fichtelberg (Erzgebirge), Deutschland

Tabelle 9. Fortsetzung.

Art	Herkunft
<u>Lepidoptera (Schmetterlinge)^L</u>	
Noctuidae (Eulenfalter)	
<i>Spodoptera exigua</i>	Bayer Cropsience AG, Monheim Deutschland
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Laborpopulation: Abt. Entomologie, MPI chemische Ökologie
<i>Spodoptera littoralis</i>	Syngenta Crop Protection Münchwilen AG, Stein Schweiz
<i>Spodoptera eridania</i>	BASF Corporation, Florham Park NJ USA
<i>Heliothis armigera</i>	Laborpopulation: Abt. Entomologie, MPI chemische Ökologie
<i>Heliothis subflexa</i>	Laborpopulation: Abt. Entomologie, MPI chemische Ökologie
<i>Heliothis virescens</i>	Laborpopulation: Abt. Entomologie, MPI chemische Ökologie
<i>Orthosia cerasi</i> *	Gesammelt: Jena, Deutschland
Sphingidae (Schwärmer)	
<i>Manduca sexta</i>	Laborpopulation: Abt. Biochemie, MPI chemische Ökologie
Yponomeutidae (Gespinstmotten)	
<i>Yponomeuta evonymellus</i> *	Gesammelt: Eschweiler, Deutschland
Plutellidae (Schleier- und Halbmotten)	
<i>Plutella xylostella</i>	Laborpopulation: Abt. Entomologie, MPI chemische Ökologie
Lasiocampidae (Glucken)	
<i>Malacosoma</i> sp.*	Gesammelt: Jena, Deutschland
Nymphalidae (Edelfalter)	
<i>Aglais urticae</i> *	Gesammelt: Heubach-Lautern, Deutschland

* vorläufige Bestimmung

Generelle Aufzucht der Insekten

Lepidoptera-Larven wurden standardmäßig mit Bohnenfutter aufgezogen. 5 l Standardfutter enthielten ca. 500 g Bohnenmehl, 9 g Ascorbinsäure, 9 g 4-Hydroxybenzoesäureethylester (Alfa Aesar), 9 g einer 7%-Vitamin E-Lösung in Speiseöl, 1 g β -Sitosterol, 1 g Leucin, 10 g ein Vitamingemisch (MP) und 75 g Agar. Der Agar wurde in Wasser aufgekocht und mit den übrigen Zutaten vermischt. Das Futter wurde zweimal pro Woche ausgetauscht.

Chrysomeliden wurden mit Pflanzen gefüttert: Chinakohl (*Phaedon cochleariae*), Stumpfbblatt-Ampher (*Gastrophysa viridula*), Limabohne (*Epilachna varivestis*), Schwarzerle (*Linnaeidea aenea*) und Bruchweide (*Plagiodera versicolora*). Die selbst eingesammelten Insekten wurden mit der Pflanze gefüttert, auf der sie gefunden worden waren.

Experimente mit *Spodoptera*-Larven

Wurden *S. littoralis*-Larven für Experimente verwendet, wurden diese einzeln gehalten, um Kannibalismus auszuschließen.

Minimalfutter

Für Experimente mit *S. littoralis* wurde definiertes Minimalfutter verwendet, welches als einzige Proteinquelle Casein enthält ¹¹⁵. 30 g Agar wurden mit 800 ml Wasser aufgekocht und mit 40 g Casein, 1 g L-Cystein, 40 g Saccharose, 50 g Cellulose, 2,5 g 4-Hydroxybenzoesäureethylester (Alfa Aesar), 1,5 g Sorbinsäure, 10 g Wesson-Salzmixtur (MP), 2,5 mg Cobaltchlorid, 2,5 mg Natriummolybdat, 5 mg Zinkacetat und 3 ml einer 10 M Kaliumhydroxid-Lösung in einem Mixer vermischt. 5 g Speiseöl, 0,5 g Cholesterol (Acros), 0,25 g β -Carotin, 5 mg Cholecalciferol (Enzo Life Sciences), 10 g Vanderzant Vitamin-Mixtur und 5 mg Menadion wurden in 10 ml Ethanol vorgelöst und zu der abgekühlten Mischung gegeben.

Variable Eisenkonzentration

Um eisenfreies Futter herzustellen, wurde eine Wesson-Salzmixtur ohne Eisen hergestellt. Diese enthielt 42 g Calciumcarbonat, 18 g Magnesiumsulfat*7H₂O, 24 g Kaliumchlorid, 62 g Kaliumdihydrogenphosphat, 21 g NaCl, 29,8 g Tricalciumphosphat, 78 mg Kupfersulfat*5H₂O, 40 mg Mangansulfat*H₂O, 18 mg Kaliumaluminiumsulfat, 10 mg Kaliumiodid und 114 mg Natriumfluorid. Dem damit hergestellten eisenfreien Futter wurden außerdem 1 oder 10 mM Eisensulfat zugesetzt.

Variable Tryptophankonzentration

Tryptophanfreies Futter enthielt statt Casein bakterielles Caseinhydrolysat (Roth), welches laut Hersteller tryptophanfrei ist. Diesem Futter wurden außerdem entweder 1,95 oder 19,5 mmol/g Tryptophan zugesetzt.

Fütterung von 8-HQA-Vorstufen

Um zu prüfen, ob Larven L-Tryptophan, L-Kynurenin (Enzo Life Sciences), 3-Hydroxy-DL-kynurenin, Xanthurensäure, Kynurensäure und Chinaldinsäure (Enzo Life Sciences) in 8-HQA umsetzen können, wurden wässrige Lösungen (10 mg/ml) hergestellt und jeweils 20-100 μ l je Larve auf tryptophanfreies Minimalfutter gegeben.

Um eine definierte Menge einer deuterierten Vorstufe zu füttern, wurde diese auf ein kleines Stück Salatblatt aufgetragen. Dieses wurde komplett gefressen.

Antibiotika

Um zu prüfen, ob Bakterien für die Bildung der 8-HQA verantwortlich sind, wurde antibiotikahaltiges Futter eingesetzt. Es wurde eine Mischung aus folgenden Antibiotika hergestellt: Erythromycin (73 µg/ml), Polymyxin (500 ng/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und Vancomycin (10 µg/ml). Von dieser Mischung wurden je Larve 100 µl auf Minimalfutter gegeben. Tabelle 10 fasst das Wirkungsspektrum der Antibiotika zusammen.

Tabelle 10. Wirkung der Antibiotika gegen Bakterien.

Antibiotikum	Effekt gegen welche Bakterien	
Erythromycin	bakteriostatisch	grampositiv
Vancomycin	bakteriostatisch bakterizid	grampositiv
Polymyxin	bakterizid	gramnegativ
Tetracyclin	bakteriostatisch	grampositiv gramnegativ

Regurgitatentnahme

Um den Vorderdarminhalt von *Spodoptera*, *Heliothis* oder *M. sexta*-Larven zu sammeln, wurden die Insekten mit einer weichen Pinzette am Kopf festgehalten und mit einer Pipettenspitze gereizt, bis das Regurgitat hervortrat. Dieses wurde mit der Pipette aufgenommen. Vor der Analytik wurde das Regurgitat zentrifugiert und der Überstand verwendet. Für die Quantifizierung von 8-HQA über HPLC-MS wurden 1-20 µl Regurgitat mit 100 µl Methanol-Wasser (1:1) gemischt und zentrifugiert.

Mikroinjektion

Deuterierte Vorstufen wurden mit Hilfe eines FemtoJet® Mikroinjektors (Eppendorf) injiziert. Die festgelegten Werte waren: P_c 150 hPa (Kompensationsdruck), P_i 50 hPa (Injektionsdruck) und t_i 2 s (Injektionsdauer). Das Injektionsvolumen war damit ca. 1 µl.

Ganze Insekten

Um die 8-HQA-Menge im ganzen Tier zu bestimmen, wurden Larven, Puppen oder Adulti in Methanol mit Hilfe eines Polytron PT 1300 D (Kinematica) oder Ultra-Turrax T25 (IKA) homogenisiert. Der Überstand wurde abgedampft und wieder in Methanol aufgenommen.

Sezierungen

S. littoralis-Larven wurden unter einem Stereomikroskop (Zeiss Stemi 2000 C) in Ringerlösung¹¹⁶ seziiert. Die Zusammensetzung war: 7,1 mM CaCl_2 , 22 mM $\text{Na}_2\text{-}\beta$ -Glycerophosphat, 13,5 mM MgSO_4 , 26,9 mM MgCl_2 , 29,5 mM KCl und 23,9 mM Glukose. Der pH-Wert wurde mit KH_2PO_4 auf 6,8 eingestellt.

Ergebnisse

Die Bildung von *N*-Acylaminosäuren durch bakterielle Enzyme

*Viele Bakterienstämme aus dem Larvendarm können *N*-Linolenoyl-L-glutamin bilden*

Im Labor von Prof. Dr. Konrad Dettner (Universität Bayreuth) wurden aus Därmen von *S. exigua*-Larven Bakterienstämme isoliert ⁴⁵. Die Stämme wurden nach der Larvenart als Se-Stämme bezeichnet. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass viele dieser Darmbakterien *N*-Acylaminosäuren produzieren können, sogenannte Konjugationsaktivität besitzen. Somit stellen sie möglicherweise eine zusätzliche trophische Ebene in der indirekten Verteidigung von Pflanzen dar ¹.

Nach erneuter Überprüfung durch 16S-rDNA-Analyse wurden 11 verschiedene Stämme für weitere Versuche verwendet. Die Bakterienstämme wurden über 24 h in BHI-Medium kultiviert und deren Konjugationsaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft. Dazu wurden aufgeschlossene Zellen 3 h bei 37°C mit Linolensäure und L-Glutamin inkubiert und die Menge gebildeten *N*-Linolenoyl-L-glutamins über HPLC-MS quantifiziert (Reaktion Abbildung 17).

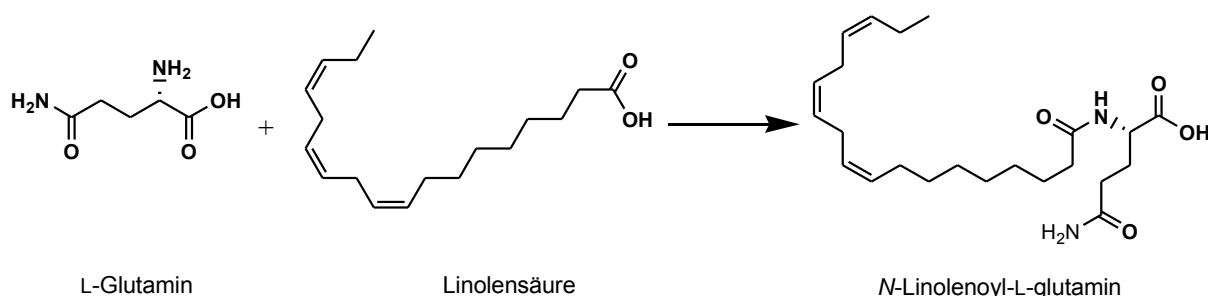


Abbildung 17. Bildung von *N*-Linolenoyl-L-glutamin aus L-Glutamin und Linolensäure zur Überprüfung der Konjugationsaktivität im Standardassay.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Von *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* und *Stenotrophomonas maltophilia* wurde nur ein Zeitpunkt (24 h) gemessen. Außerdem wurden drei Bakterienstämme von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erworben, welche mit dem entsprechenden Darmisolat verglichen wurden. Darmisolat und DSMZ-Stamm von *Enterococcus mundtii* (DSMZ 4838), *M. arborescens* (DSMZ 20754) und *A. nicotianae* (DSMZ 20123) waren sich jeweils sehr ähnlich hinsichtlich der Menge gebildeten *N*-Linolenoyl-L-glutamins und des Verlaufs der Aktivität über die Wachstumskurve.

Tabelle 11. Konjugationsaktivität der verwendeten Se-Stämme. Die Tabelle listet die Isolate und deren Fähigkeit zur Konjugatbildung auf. Die Produktmenge (*N*-Linolenoyl-L-glutamin) ist bezogen auf 25 µl (OD₆₀₀ = 2) einer 24 h-alten Kultur im Standardassay (n = 3). Der Aktivitätszeitpunkt beschreibt, ob ein Stamm über die komplette Wachstumskurve aktiv war oder ob ein Anstieg der Aktivität in der stationären Phase beobachtet werden konnte. Bei drei Stämmen wurde ein DSMZ-Stamm als Vergleich herangezogen.

Isolat	Artenname	Aktivität	Produktmenge/ng	Aktivitätszeitpunkt	DSMZ*-Stamm: Produktmenge/ng
Proteobacteria**					
Se 4	<i>Klebsiella</i> sp.	+	165 ± 36,1	Nur „24 h“ gemessen	n. g.
Se 9	<i>Ochrobactrum</i> sp.	+	76,7 ± 12,6	Konstant aktiv	n. g.
Se 17	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	0	Nur „24 h“ gemessen	n. g.
Se 59	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	42,7 ± 2,8	Nur „24 h“ gemessen	n. g.
Firmicutes*					
Se 8	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	183,3 ± 17,6	Nur „24 h“ gemessen	n. g.
Se 69	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	0	Nicht aktiv	n. g.
Se 12	<i>Enterococcus mundtii</i>	-	0	Nicht aktiv	0
Se 51	<i>Enterococcus rottae</i>	-	0	Nicht aktiv	n. g.
Actinobacteria*					
Se 14	<i>Microbacterium arborescens</i>	+	438,3 ± 46,2	Konstant aktiv	356,7 ± 32,5
Se 18	<i>Leucobacter komagatae</i>	+	1,0 ± 0,3	Anstieg stat. Phase	n. g.
Se 35	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	+	43,3 ± 10,3	Anstieg stat. Phase	15,3 ± 17,1

*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; **Phylum; n. g. = nicht getestet

Sieben der 11 überprüften Stämme zeigten Konjugationsaktivität. Dabei schienen verwandtschaftliche Verhältnisse keine Rolle zu spielen. Die Se-Stämme gehören zu drei verschiedenen Phyla, das heißt auch verwandtschaftlich weit entfernte Arten zeigten im gleichen Maße Konjugationsaktivität (wie Se 59 und Se 35). Jedoch unterschieden sich nahe verwandte Arten, wie die beiden *Staphylococcus*-Stämme, deutlich.

Zwei der Se-Stämme (Se 14 und Se 9) waren über alle Wachstumsphasen gleichbleibend aktiv. Im Gegensatz dazu konnte bei zwei anderen Stämmen in der stationären Wachstumsphase ein Anstieg der Aktivität festgestellt werden (Se 18, Se 35). Dieser Unterschied der Konjugationsaktivität über den Verlauf der Wachstumskurve wird in Abbildung 18 am Beispiel von Se 14 und Se 35 dargestellt.

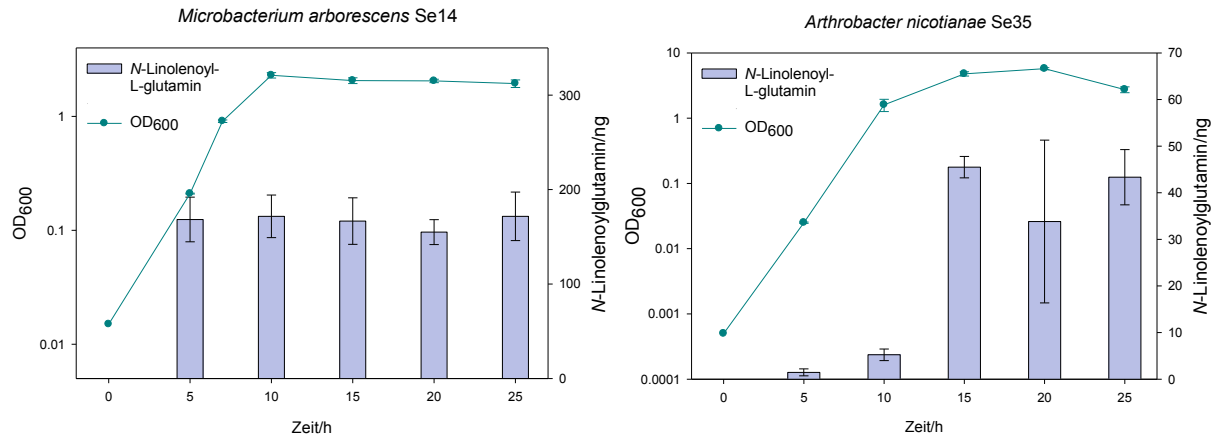


Abbildung 18. Konjugationsaktivität von Se 14 und Se 35 über den Verlauf der Wachstumskurve. Die Kurven zeigen das Wachstum der Bakterienkultur. Die Balken zeigen die Konjugationsaktivität als Menge gebildeten *N*-Linolenoyl-L-glutamins von 25 µl Kultur. Die Proben zu verschiedenen Zeitpunkten wurden vor dem Aktivitätsassay auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt. (n = 3)

Zudem konnten deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen bei der gebildeten Produktmenge festgestellt werden. Aufgeschlossene Zellen (OD₆₀₀ = 2) einer 24 h-alten Kultur von *M. arborescens* Se 14 bildeten im Aktivitätsassay $438,3 \pm 46,2$ ng *N*-Linolenoyl-L-glutamin, während bei *Leucobacter komagatae* Se 18 im gleichen Assay nur $1,0 \pm 0,3$ ng gemessen werden konnten. Diese Unterschiede deuten auf verschiedene Mechanismen zur Bildung der Konjugate hin.

Ein bekanntes Konjugationsenzym AAH kommt nicht in anderen Stämmen vor

Zwischen den verschiedenen Darmbakterienstämmen konnten Unterschiede hinsichtlich ihrer Konjugationsaktivität festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Bakterienstämmen unterschiedliche Mechanismen oder Enzyme zur Bildung der Konjugate einsetzen. In früheren Studien konnte aus *M. arborescens* Se 14 bereits ein Enzym (AAH) isoliert werden, welches *N*-Linolenoyl-L-glutamin aus Linolensäure und L-Glutamin bilden und hydrolysieren kann ². Das Protein wurde charakterisiert und das kodierende *afp*-Gen identifiziert. Ob AAH auch in anderen Darmbakterienstämmen vorkommt, sollte über Western Blot und Southern Blot-Analysen geklärt werden.

Für die Westen Blots wurde der Proteinrohextrakt der Se-Stämme in einem denaturierenden PA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurden ein primärer AAH-Antikörper und ein peroxidasegekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Wie auf Abbildung 19 erkennbar, konnte nur in *M. arborescens* Se 14 das AAH-Protein detektiert werden. Im Proteinextrakt der anderen Se-Stämme erschien kein spezifisches Signal.

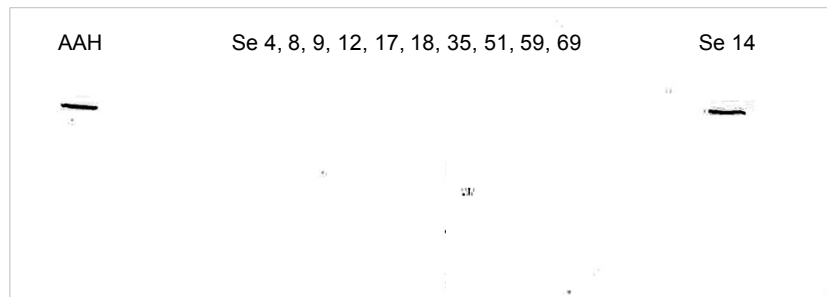


Abbildung 19. Western Blot-Analyse der Se-Stämme mit einem AAH-Antikörper. Aufgetragen wurde gereinigte AAH und Proteinrohextrakt der Se-Stämme.

Für die Southern Blot-Analysen wurde die DNA der Se-Stämme extrahiert, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion erfolgte über eine Digoxigenin-markierte *afp*-Sonde. Auch die Southern Blot-Analysen zeigten in keinem anderen Stamm als Se 14 eine Hybridisierung mit der *afp*-Sonde (Abbildung 20). Die anderen konjugationsaktiven Stämme scheinen demnach ein anderes Enzym als die bekannte AAH zu verwenden.

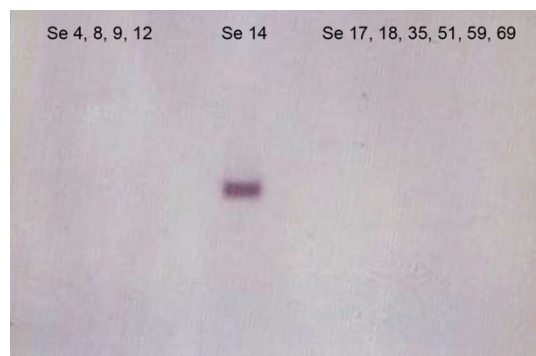


Abbildung 20. Southern Blot der Se-Stämme mit einer *afp*-Sonde. Es wurden jeweils 7 µg DNA aufgetragen.

Darmbakterien besitzen sehr unterschiedliche Konjugationsenzyme

Darmbakterien setzen wahrscheinlich unterschiedliche Enzyme ein, um *N*-Acylaminosäuren zu bilden. Daher sollten nun weitere Enzyme aus anderen Bakterienstämmen isoliert werden, um festzustellen, ob sich hier Homologien aufzeigen lassen. Der gewählte Bakterienstamm für eine Enzymisolation sollte sowohl eine hohe Konjugationsaktivität aufweisen als auch risikolos kultivierbar sein. *A. nicotianae* Se 35 wurde daher ausgewählt. Der zweite Stamm war *R. erythropolis* (DSMZ 43066). Dieser Stamm war zuvor ebenfalls im

Labor von Prof. Dr. Konrad Dettner aus dem Darm von *S. exigua* isoliert worden, stand aber leider nicht mehr zur Verfügung. Daher wurde der entsprechende DSMZ-Stamm verwendet, welcher ebenfalls eine hohe Konjugationsaktivität aufwies ($246,7 \pm 70,9$ ng *N*-Linolenoyl-L-glutamin im Standardassay). Die Proteinreinigung erfolgte in zwei flüssigchromatographischen Schritten unter Verwendung des ÄKTA-Explorers 10 (GE Healthcare). Die Bakterienstämme wurden in BHI-Medium kultiviert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Der Proteinrohextrakt wurde über Anionenaustauschchromatographie (AIEX) mit einem Salzgradienten von 0,2 bis 0,5 M NaCl über eine Resource Q-Säule aufgetrennt (Abbildungen 21.A und C). Die entstehenden Fraktionen wurden auf ihre Konjugationsaktivität getestet und für die Größenausschlusschromatographie (SE) weiterverwendet. Diese erfolgte isokratisch über eine Superdex 200 pg-Säule (Abbildungen 21.B und D). Die dabei entstandenen Proteinfraktionen wurden ebenfalls auf ihre Aktivität getestet.

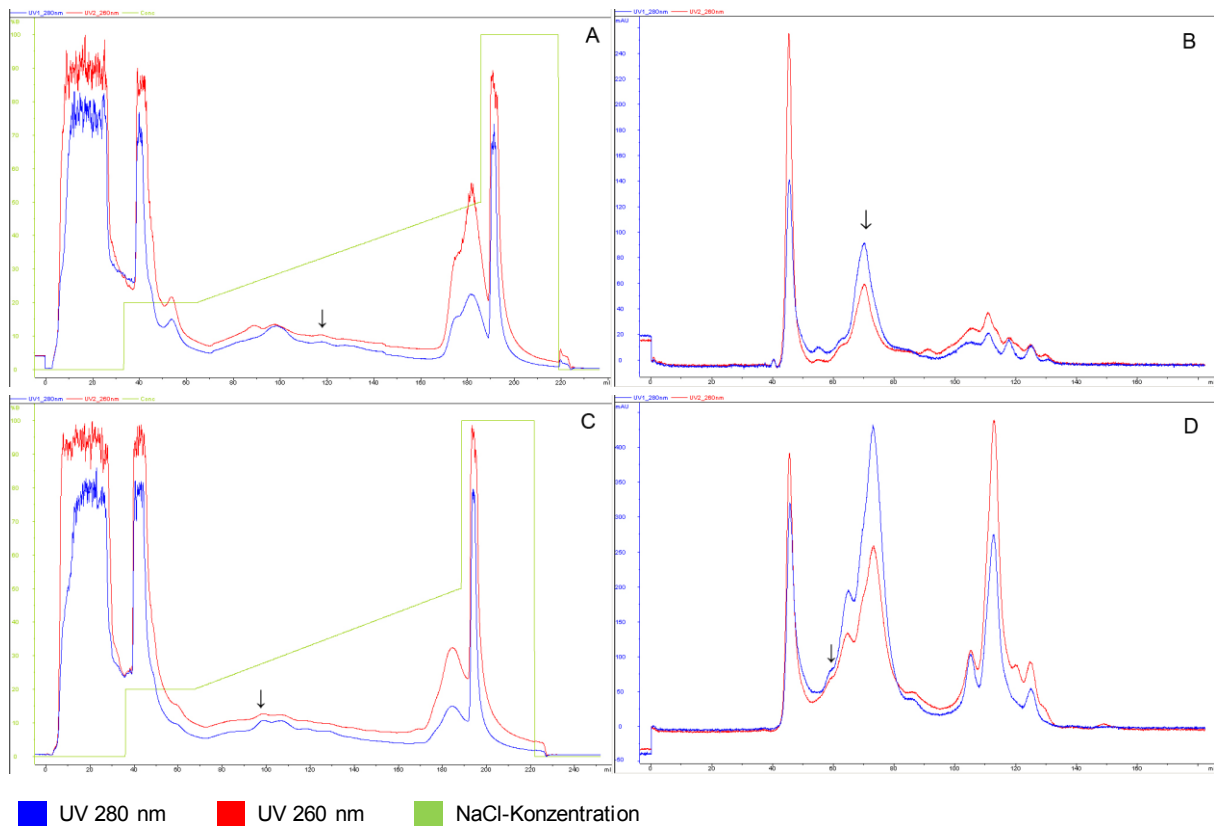


Abbildung 21. Flüssigchromatographische Trennungen des Rohextraktes von *A. nicotianae* und *R. erythropolis*. **(A)** *A. nicotianae*, AIEX; **(B)** *A. nicotianae*, SE-Trennung; **(C)** *R. erythropolis*, AIEX; **(D)** *R. erythropolis*, SE-Trennung. Blaue und rote Linien zeigen die Proteinkonzentration an, welche über die UV-Absorption gemessen wird. Die grüne Linie zeigt den NaCl-Gradienten. Pfeile zeigen aktive Fraktionen an.

Tabelle 12 zeigt in welchen Bereichen des Gradienten die aktiven Proteinfraktionen von *A. nicotianae* und *R. erythropolis* von den verwendeten Säulen eluierten.

Tabelle 12. Elution aktiver Fraktionen bei der AIEX- und SE-Chromatographie.

Bakterienstamm	AIEX	SE
<i>A. nicotianae</i> (Se 35)	0,32 bis 0,37 M NaCl	70 ml
<i>R. erythropolis</i> (DSMZ)	0,27 bis 0,28 M NaCl	58 ml

Nach den chromatographischen Schritten folgte schließlich eine Auftrennung über 2D-Gelelektrophorese, um die Reinheit der aktiven Fraktionen zu überprüfen. Sichtbare Proteine wurden aus dem Gel ausgestochen, tryptisch verdaut und über MSMS-Fragmentierung *de-novo*-sequenziert. Die resultierenden Peptidsequenzen wurden einer MS-BLAST-Suche unter Verwendung der UniRef100-Datenbank (UniProt Reference Clusters, European Bioinformatics Institute) unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Für *A. nicotianae* gelang es nicht, ein einzelnes konjugationsaktives Protein zu reinigen. Auch nach zahlreichen Optimierungsversuchen befanden sich auf dem 2D-Gel noch 5-7 Proteine. Bei der Reinigung für *R. erythropolis* konnten hingegen aktive Fraktionen gereinigt werden, welche auf dem 2D-Gel nur ein Protein zeigten. Abbildung 22 zeigt das 2D-Gel für eine gereinigte aktive Fraktion von *A. nicotianae*.

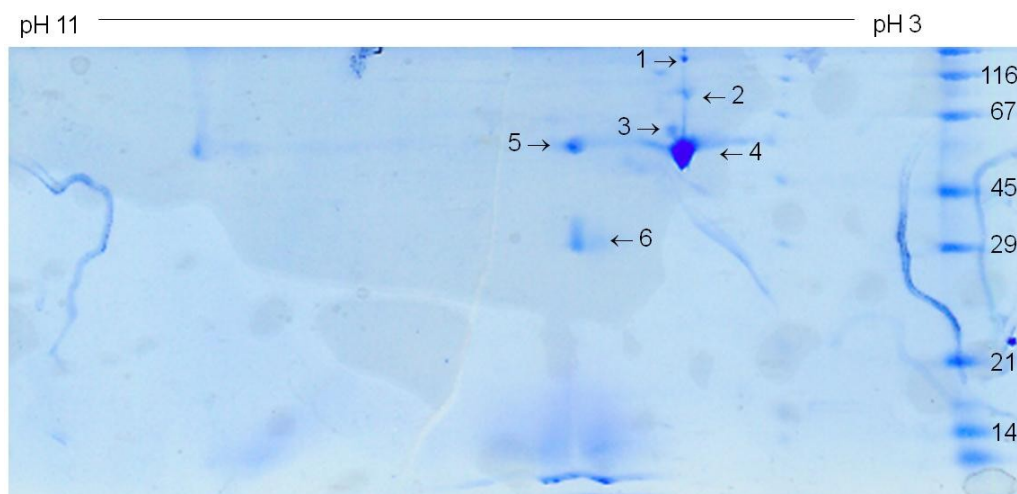


Abbildung 22. 2D-PA-Gel einer gereinigten konjugationsaktiven Proteinfraction von *A. nicotianae* Se 35. Rechts wurde ein Proteinmarker aufgetragen. Die Zahlen zeigen die Proteingröße in kDa. Oberhalb des Bildes ist der pH-Bereich des IPG-Streifens angegeben.

Das Hauptprotein (Nr. 4) konnte als Putrescinoxidase (PUOX) identifiziert werden. Die BLAST-Suche ergab zahlreiche Treffer für dieses Protein aus anderen verwandten Bakterienarten wie z. B. *Rhodococcus*-Stämmen aber auch aus *Arthrobacter*-Stämmen. Die anderen Proteine konnten als Aminopeptidase N (Nr. 2), 2-Isopropylmalatsynthase (Nr. 3), Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (Nr. 5) und Chloritdismutase (Nr. 6) identifiziert werden. Ob wirklich das Hauptprotein PUOX die Aktivität der Proteinfraction bestimmt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Dieses Protein trat allerdings in allen Reinigungen auf,

während die übrigen Proteine in anderen Ansätzen zum Teil fehlten oder durch andere ersetzt wurden.

Tabelle 13. Überblick über die Ergebnisse der *de-novo*-Sequenzierung. Die nummerierten Proteine stammen aus den Proteinaufreinigungen von *A. nicotianae* (1-6) und *R. erythropolis* (7). Die Peptidsequenzen aus der *de-novo*-Sequenzierung wurden einer MS-BLAST-Suche unter Verwendung der UniRef100-Datenbank unterzogen. Die Tabelle gibt an, welche Protein-Homologien aus welchen Organismen gefunden wurden.

Protein	Peptid	Homologie	Organismus	Datenbankeintrag*
1	(-)LVAVLPNLYSR(-) (-)ADAMWELDDEAR(-) (-)LSYVPALPR(-)	Putrescinoxidase	<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp.	Q0S500 A0JQX1
	(-)FSGATSYDLGVAYR(-) (-)SLYVPALPR(-)	Peptidase	<i>Arthrospira maxima</i>	B5W399
	(R)MFAVFEQPDLK(A) (R)TEVETDEAGTITALR(L) (R)ADATATGALAAVQAR(A) (R)DSSVVQTLLR(Q) (R)GTVPEALIER(R) (R)LAVGFYDVDEATGR(L) (R)LDDASWEASSTR(L) (R)AAVPTAEAK(R) (R)AGEAEIAEAER(A)	Aminopeptidase N	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Cellulomonas flavigena</i> <i>Arthrobacter</i> sp.	C5CAW4 C1RJI2 A0JXL9 A1R7A8
3	(-)NEEDGLVDLAVQGAR(-) (R)GTGVAAAELGYLAGADR(I) (R)SVSSASGEDGAFR(M) (-)MFDLLVSNYMK(-) (R)IEGCLFGNGER(T) (-)TGQGDGPLSALVK(-) (R)TVEYCNQLPVPER(H) (K)AVVSAVNR(A) (R)TFEALLEGADR(A) (-)NSARTDNLDLPR(-)	2-isopropylmalat-synthase	<i>M. luteus</i> <i>Arthrobacter</i> sp.	C5CCC3 A1R6V4 B8H8Q9 A0JX36
4	(-)LSYDPALPR(-) (-)ADAMWELDDEAR(-) (-)DGLELVFLNNPVLK(-) (-)SVAVLEAR(-) (-)FSGATSYDLGGLYR(-) (-)VLVALPPNLYSR(-)	Putrescinoxidase	<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp.	B0F9F6 C1AWZ5 C1A3D2 A0JQX1

Tabelle 13. Fortsetzung

5	(-)LVSENEADV DGT VYK(-) (-)GYLNTTLETVDLAGVR(-) (-)YGLNTTLETVDLLNR(-) (-)AYLHAAELAENAR(-) (-)FNTGVFFEK(-) (-)NEFAGLESPFY NLAGDGK(-) (-)YLLLATGSTSK(-)	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	<i>Kocuria rhizophila</i> <i>M. luteus</i> <i>Arthrobacter</i> sp.	B2GJ83 C5CCM5 Q93HV8 B8HH05 A0JVD6
6	(-)DHSPAFAR(-) (-)DCLMTVYPFVR(-) (-)EETPFYTGR(-)	Chloritdismutase	<i>Arthrobacter</i> sp.	A0JYM8 B8HBR8 A1R8A3
7	(-)VAQLYDQVLVR(-) (-)TAQNELDEDAK(-) (-)GLTWGGSQVR(-) (-)LTNTYESGVLTGK(-)	Glutamatdehydrogenase	<i>Rhodococcus</i> sp.	C1A1R9 Q0SGW0 C1AVT4

*UniProt Reference Clusters, European Bioinformatics Institute

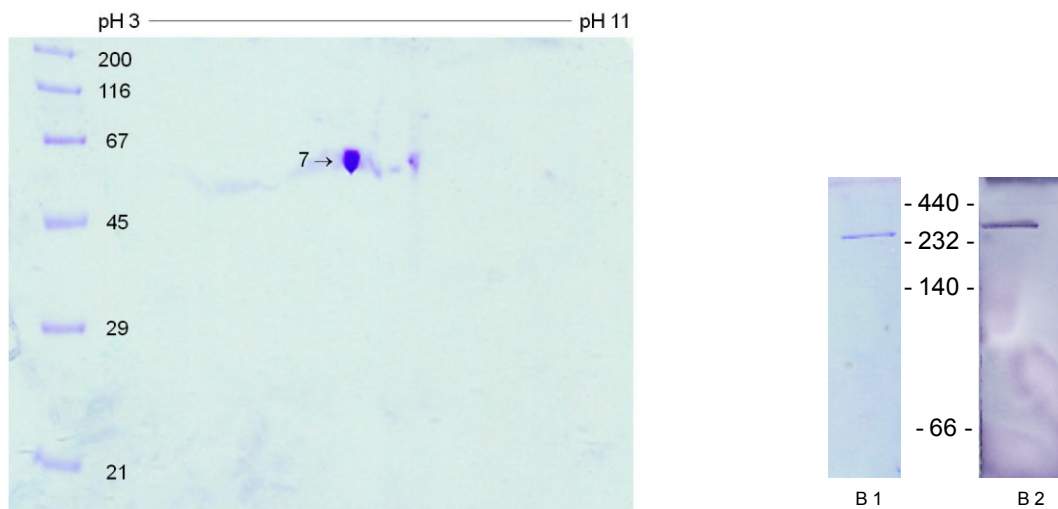


Abbildung 23. PA-Gele einer gereinigten konjugationsaktiven Proteinfraction *R. erythropolis*. **(A)** 2D-PA-Gel. Der nummerierte Pfeil zeigt das sequenzierte Protein. Links wurde ein Proteinmarker aufgetragen. Die Zahlen zeigen die Proteingröße in kDa. Oberhalb des Bildes ist der pH-Bereich des IPG-Streifens angegeben **(B)** Natives 1D-PA-Gel **1.** Anfärbung mit Coomassie-Blau **2.** Nachweis der GDH-Aktivität mit einem NBT/PMS-Assay. Die GDH ist ein Hexamer und zeigt im nativen Gel bei ca. 288 kDa eine Bande. Ein Proteinmarker wurde mit aufgetragen. Die Zahlen in der Bildmitte zeigen die Proteingröße in kDa.

Abbildung 23.A zeigt das 2D-Gel für eine aktive Proteinfraction von *R. erythropolis*. Dieses Protein konnte eindeutig identifiziert werden als Glutamatdehydrogenase (GDH; Tabelle 13). Eine aktive Proteinfraction wurde außerdem in einem nativen PA-Gel aufgetrennt und die GDH-Aktivität mittels In-Gel-Assay überprüft. Der Nachweis dieser Aktivität erfolgte indirekt über das bei der Reaktion von Glutamat zu 2-Oxoglutarat entstehende NADPH. Eingesetztes

NBT wird durch NADPH und mit Hilfe des Elektronentransporters PMS zu einem blauen Formazan-Farbstoff reduziert. Wie in Abbildung 23.B zu erkennen, konnte die Aktivität durch die violette Bande im Gel bestätigt werden.

Aktive Proteinfractionen konjugationsaktiver Bakterien wurden gereinigt. Es konnte keine homogene Gruppe konjugationsaktiver Enzyme gefunden werden. Während *M. arborescens* ein aktives DPS-Protein hat, nutzt *R. erythropolis* wahrscheinlich eine GDH. *A. nicotianae* hat wieder ein anderes Konjugationsenzym, bei dem es sich möglicherweise um eine PUOX handelt.

Heterologe Expression konjugationsaktiver Enzyme

Als Kandidaten für bakterielle konjugationsaktive Enzyme waren vor allem eine GDH aus *R. erythropolis* und eine PUOX aus *A. nicotianae* wahrscheinlich. Um dies zu überprüfen, sollten diese Proteine heterolog exprimiert werden. Auch von dem zuvor bereits bekannten AAH aus *M. arborescens* Se 14 lag bislang kein aktives heterolog exprimiertes Protein vor. AAH ist ein eisenhaltiges DPS-Protein und hat Peroxidaseaktivität ².

Da weder von *R. erythropolis* noch von *A. nicotianae* genomische Sequenzen bekannt waren, wurden Gene verwandter Arten exprimiert. *R. opacus* (DSMZ 43205) und *A. aurescens* (DSMZ 20116) zeigten Konjugationsaktivität und die Gensequenzen der Proteine sind bekannt.

Wie im „Material und Methoden“-Teil beschrieben, wurden die Gene *afp* (mas0001), *gdh* (RHA1_ro01405) und *puo* (AAur_0043) amplifiziert und jeweils in einen pET28 Vector (Novagen) kloniert. Die drei Plasmide (bezeichnet als pET28b-*afp*, pET28c-*gdh* und pET28a-*puo*) wurden in *E. coli* NEB 5-alpha bzw. XL1Blue transformiert. Korrekte Klonierung wurde über PCR und Sequenzierung (MWG) bestätigt. Die Proteinexpression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3). AAH wurde außerdem in *E. coli* OrigamiTM 2 (DE3) und *E. coli* RosettaTM exprimiert.

Der Proteinrohextrakt wurde in denaturierenden PA-Gelen aufgetrennt. Abbildung 24 zeigt den aufgetrennten Proteinrohextrakt der drei transformierten *E. coli* BL21-Stämme, je von einer nicht induzierten (-) und einer IPTG-induzierten (+) Kultur. Alle drei Proteine wurden erfolgreich exprimiert.

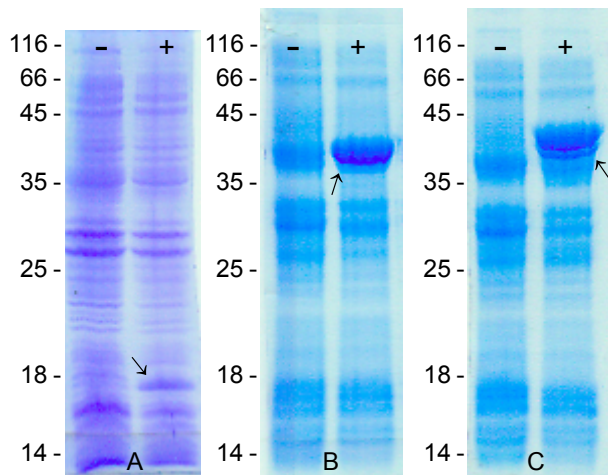


Abbildung 24. Auftrennung des Proteinroh-extraktes der drei transformierten *E. coli* BL21-Stämme im denaturierenden PA-Gel. **(A)** pET28b-*afp* **(B)** pET28c-*gdh* **(C)** pET28a-*puo* Dargestellt ist jeweils die nicht induzierte (-) und die IPTG-induzierte (+) Kultur. Heterologe Proteinexpression ist jeweils in der (+)- Spur durch einen Pfeil markiert. Ein Proteinmarker wurde mit aufgetragen. Die Zahlen am Bildrand zeigen die Proteingröße in kDa. AAH hat eine Masse von 17 kDa. Nach Berechnungen hat GDH eine Masse von ca. 48 kDa und PUOX von ca. 50 kDa.

Die heterolog exprimierten Proteine konnten anschließend über den Histidin-Tag in einer Nickel-Sepharose-Säule (His-Trap HP™, GE-Healthcare) gereinigt werden. Die Aktivität wurde mittels In-Gel-Assays überprüft. Dazu wurde der *E. coli*-Proteinrohextrakt oder das gereinigte Protein, wie im „Material und Methoden“-Teil beschrieben, in einem nativen PA-Gel aufgetrennt und anschließend einem Aktivitätsassay unterzogen.

Im Falle von AAH wurde die Peroxidaseaktivität durch Zugabe von H₂O₂ und AEC nachgewiesen. Bei der Umsetzung von H₂O₂ durch Peroxidasen werden Protonen frei, welche AEC zu einem rot-braunen Farbstoff oxidieren¹¹². Wie auf Abbildung 25.B erkennbar, entstehen dadurch farbige Banden im Gel. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die heterolog exprimierte AAH eisenhaltig ist. Das Gel wurde mit Kaliumhexacyanoferrat(III) inkubiert, welches mit Fe²⁺ eine blaue Verbindung eingeht (Abbildung 25.C).

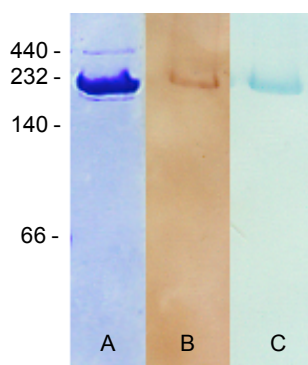


Abbildung 25. Gereinigte AAH, aufgetrennt in einem nativen PA-Gel. **(A)** Anfärbung mit Coomassie-Blau. **(B)** Peroxidase-Nachweis mit AEC **(C)** Eisenfärbung mit Kaliumhexacyanoferrat(III). Ein Proteinmarker wurde mit aufgetragen. Die Zahlen am Bildrand zeigen die Proteingröße in kDa. AAH ist ein Dodecamer und im nativen PA-Gel erscheint eine Bande bei 204 kDa.

Der Nachweis der GDH-Aktivität erfolgte nach dem bereits beschriebenen NBT/PMS-Assay. Abbildung 26 zeigt den in einem nativen PA-Gel aufgetrennten Proteinrohextrakt des pET28c-*gdh*-transformierten *E. coli*-Stamms. Verglichen wurden eine nicht induzierte (-) und eine IPTG-induzierte (+) Kultur, von denen die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden. Man erkennt eine violette Bande an der Stelle im Gel, an der GDH-Aktivität zu erwarten war. Diese Bande nahm in der induzierten *E. coli*-Kultur zu.

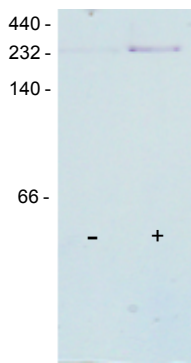


Abbildung 26. Auftrennung des Proteinrohextraktes des pET28c-*gdh*-transformierten *E. coli* BL21-Stamms in einem nativen PA-Gel. Dargestellt ist jeweils die nicht induzierte (-) und die IPTG-induzierte (+) Kultur. Nachweis der GDH-Aktivität erfolgte mit einem NBT/PMS-Assay. Ein Proteinmarker wurde mit aufgetragen. Die Zahlen am Bildrand zeigen die Proteingröße in kDa. Die GDH ist ein Hexamer und zeigt im nativen Gel bei ca. 288 kDa eine Bande.

Der Nachweis der PUOX-Aktivität erfolgte ähnlich wie der Nachweis der GDH-Aktivität¹¹². Anstelle von NADP nutzen PUOX allerdings kovalent gebundenes FAD als Kosubstrat. Dieses wird bei der Oxidation von Putrescin zu FADH reduziert. Im Enzymassay wird NBT durch FADH und mit Hilfe von PMS zu Formazan reduziert. Abbildung 27.A und B zeigen den in einem nativen PA-Gel aufgetrennten Proteinrohextrakt des pET28a-*puo*-transformierten *E. coli*-Stamms. Verglichen wurden eine nicht induzierte (-) und eine IPTG-induzierte (+) Kultur, von denen die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden. In Abbildung 27.B. erkennt man eine Zunahme der PUOX-Aktivität in der induzierten Kultur.

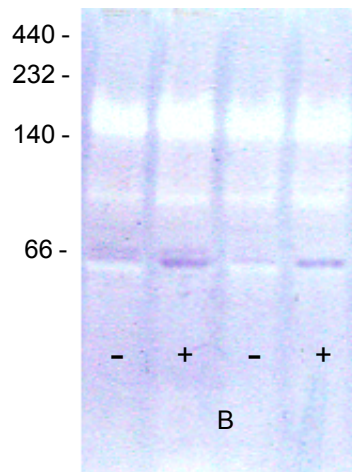
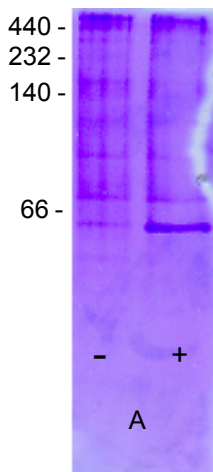


Abbildung 27. Auftrennung des Proteinrohextraktes des pET28a-*puo*-transformierten *E. coli* BL21-Stamms in einem nativen PA-Gel. Dargestellt ist jeweils die nicht induzierte (-) und die IPTG-induzierte (+) Kultur. **(A)** Anfärbung mit Coomassie-Blau. **(B)** Nachweis der PUOX-Aktivität in einem NBT/PMS-Assay. Zwei verschiedene PUOX-Expressions-Ansätze wurden hier aufgetragen. Ein Proteinmarker wurde mit aufgetragen. Die Zahlen am Bildrand zeigen die Proteingröße in kDa. Die PUOX zeigt bei ca. 50 kDa eine Bande.

Alle drei Proteine konnten erfolgreich heterolog exprimiert werden. Der *E. coli*-Proteinrohextrakt und die gereinigten Proteine wurden anschließend einem Konjugationsaktivitätstest unterzogen. Dieser erfolgte wieder mit Linolensäure und L-Glutamin bei 37 °C. Überraschenderweise konnte bei keinem der drei Proteine das Produkt, *N*-Linolenoyl-L-glutamin, nachgewiesen werden. Auch die Expression von AAH in anderen *E. coli*-Stämmen (OrigamiTM 2 (DE3) und RosettaTM) führte nicht zum Erfolg. In früheren Arbeiten wurde vermutet, dass AAH posttranslational acetyliert wird. Doch leider war die

gemeinsame Expression einer Acetyltransferase mit AAH nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

Das vorliegende Ergebnis ist schwer zu interpretieren. Im Falle von gereinigter AAH konnte zuvor eindeutig gezeigt werden, dass es Konjugationsaktivität besitzt. Auch die GDH aus *R. erythropolis* scheint durch ihre hohe Reinigungsstufe ein sicherer Kandidat für ein konjugationsaktives Enzym. In beiden Fällen konnte bei dem heterolog exprimierten Protein allerdings keine Konjugationsaktivität nachgewiesen werden. Möglicherweise wird diese Nebenaktivität in Proteinen auf noch unbekannte Weise reguliert. Nicht auszuschließen ist allerdings auch, dass im Falle von GDH und PUOX die „falschen“ Proteine exprimiert wurden, da jeweils nur verwandte Arten von *R. erythropolis* und *A. nicotianae* zur Genamplifikation verwendet wurden.

In jeden Fall erscheint es so, als sei Konjugationsaktivität ein weit verbreitetes Phänomen, welches in einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteintypen auftritt.

Die Regulation von AAH, einem konjugationsaktiven DPS-Protein

AAH wird in der stationären Wachstumsphase induziert

Viele DPS-Proteine werden in der stationären Wachstumsphase und unter bestimmten Stressbedingungen induziert. Die genaue Regulation ist bei verschiedenen Arten jedoch sehr unterschiedlich. Die erste Frage zur Regulation von AAH war, ob das Protein ständig gebildet wird oder ob seine Expression wachstumsphasenabhängig ist. Von einer *M. arborescens* Se 14-Kultur wurden daher über 24 h zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und einer Western Blot-Analyse unterzogen.

Wie auf Abbildung 28 erkennbar, wurde in der exponentiellen Wachstumsphase keine AAH gebildet. Erst in der stationären Wachstumsphase, also nach ca. 9 h wurde das Protein induziert. In dieser Phase sind die Bakterienzellen vermehrten Stressbedingungen ausgesetzt und AAH scheint bei deren Bewältigung eine wichtige Rolle zuzukommen.

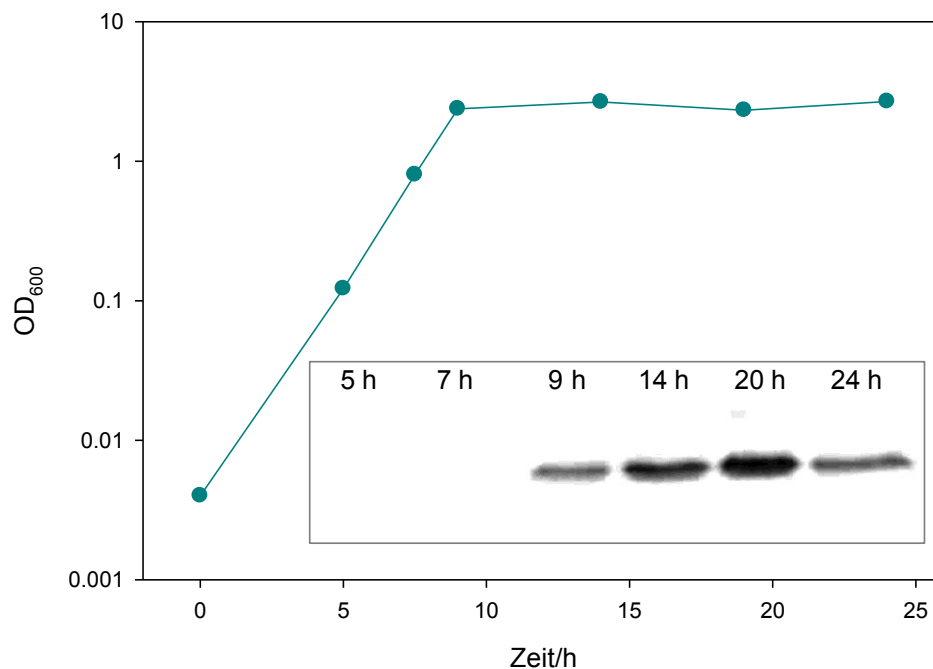


Abbildung 28. Wachstumskurve und dazugehöriger Western Blot von *M. arborescens* Se 14 über den Verlauf der Wachstumskurve. Es wurde ein AAH-Antikörper verwendet. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die OD₆₀₀ gemessen und die Probe für eine Western Blot-Analyse aufbewahrt. Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt.

AAH wird nicht durch Stressfaktoren wie H₂O₂, osmotischen Stress, Temperaturveränderungen induziert, ist jedoch pH-abhängig

Viele DPS-Proteine werden durch Stressbedingungen induziert, dabei herrschen allerdings große Unterschiede zwischen den Spezies. Um zu erfahren, unter welchen Bedingungen AAH induziert wird, wurden Se 14-Kulturen verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt. Für Langzeitexperimente wurden über 24 h von behandelten und nicht behandelten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Für Kurzzeitexperimente wurden Bakterienkulturen in der exponentiellen Phase einem Stress ausgesetzt und Proben wurden zwischen 15 min und 1 h genommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass weder H₂O₂ (10 µM-200 mM) noch hyperosmotischer Stress (0,4 M Natriumchlorid, 0,7 M Sorbit) noch rasche Temperaturänderungen auf 43°C bzw. 45°C AAH induzierten (Daten nicht gezeigt). Die Expression von AAH war jedoch pH-abhängig. Nur bei pH 7 bis 9 kam es zu einer AAH-Expression. Wie in Abbildung 29 erkennbar, wurde bei pH 6 und pH 10 keine AAH gebildet, während bei pH 8 die größte AAH-Menge vorhanden war. Interessanterweise ist die Konjugationsaktivität von *M. arborescens* nicht pH-abhängig. Auch bei pH 6 und 10 konnte

Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise besitzt dieses Bakterium mehrere Konjugationsenzyme.

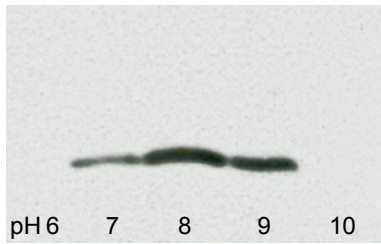


Abbildung 29. Western Blot-Analyse von *M. arborescens* Se 14 nach 24 h Wachstum bei verschiedenen pH-Werten (pH 6-10) mit einem AAH-Antikörper. Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt.

In Anwesenheit von Siderophoren wird AAH dauerhaft exprimiert

Es konnte keine Induktion von AAH durch verschiedene Stressbedingungen gezeigt werden. AAH ist jedoch ein eisenhaltiges Protein, daher lag es nahe, dass die Eisenverfügbarkeit der Umgebung seine Expression beeinflusst. Fast alle Bakterien nutzen Siderophore, um Eisen in die Zelle aufzunehmen. Die Moleküle werden sekretiert, binden spezifisch Fe³⁺ und werden dann wieder von der Zelle aufgenommen. Diese Aufnahme ist unspezifisch, viele Bakterienarten nutzen „artfremde“ Siderophore.

Daher wurde der Einfluss zweier *Streptomyces*-Siderophore (Ferrioxamin E und B) auf die AAH-Expression in *M. arborescens* Se 14 untersucht. Ferrioxamin B wurde als Deferoxaminmesilatsalz eingesetzt (Abbildung 30).

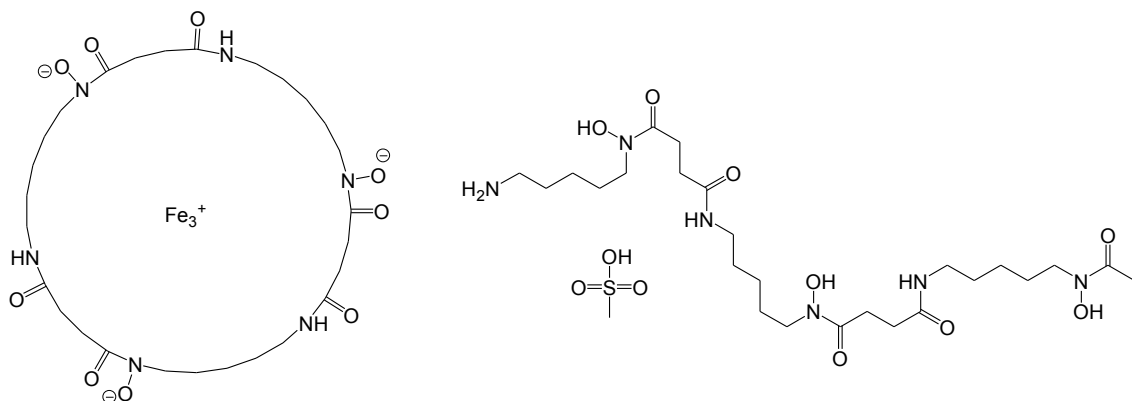


Abbildung 30. Verwendete *Streptomyces*-Siderophore Ferrioxamin E und B (Deferoxaminmesilat).

Im Langzeitexperiment (Abbildung 31) wurde deutlich, dass AAH in Anwesenheit von Deferoxaminmesilat oder Ferrioxamine E im Wachstumsmedium über alle Wachstumsphasen hinweg exprimiert wurde. In der Kontrolle kam es erst in der stationären Phase zu einer AAH-Expression. *M. arborescens* Se 14 scheint also die fremden Siderophore nutzen zu können, um kontinuierlich Eisen in die Zelle aufzunehmen. Das

gebundene Fe^{3+} in Ferrioxaminen wird in der Zelle zu Fe^{2+} reduziert. Vermutlich aufgrund dieser erhöhten Fe^{2+} -Konzentration in der Zelle wird AAH dauerhaft induziert.

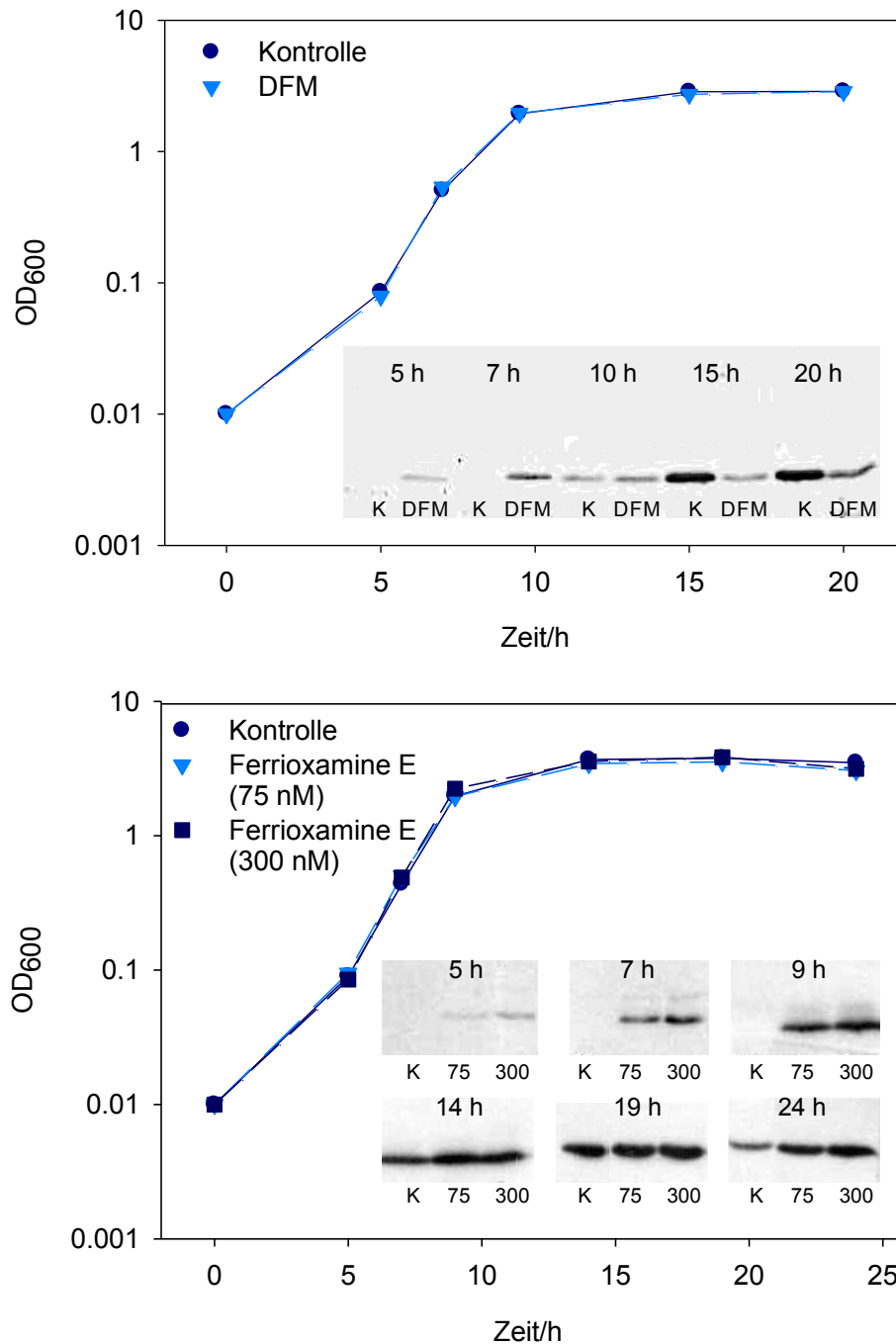


Abbildung 31. Einfluss von Deferoxaminmesilat (DFM, 100 µM) und Ferrioxamine E (75 und 300 nM) auf die AAH-Expression über die Wachstumskurve. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die OD₆₀₀ gemessen und die Probe für eine Western Blot-Analyse aufbewahrt. Es wurde ein AAH-Antikörper verwendet. Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt. K = Kontrolle in BHI-Medium.

Im Kurzzeitexperiment wurde deutlich, dass diese Induktion sehr schnell ist. Bereits 15 min nach Zugabe eines der beiden Siderophore in der exponentiellen Wachstumsphase war die Expression von AAH erhöht. Abbildung 32 zeigt dies am Beispiel von Ferrioxamin E.

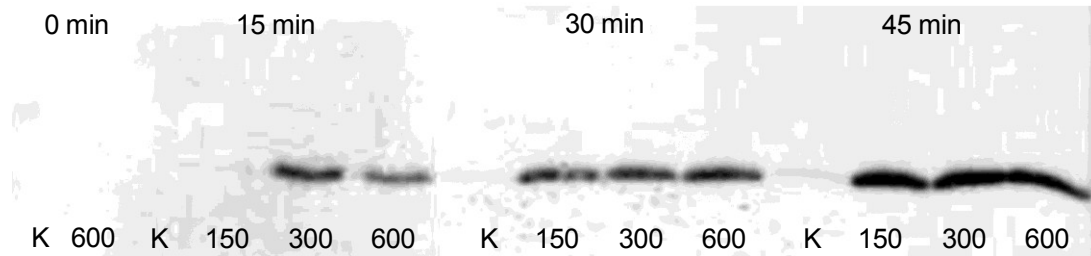


Abbildung 32. Western Blot-Analyse von *M. arborescens* Se 14. Untersucht wurde die AAH-Expression kurz nach Zugabe von Ferrioxamin E in der stationären Wachstumsphase (Konzentrationen: 0, 150, 300, 600 nM). Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt. K = Kontrolle in BHI-Medium.

Die Effekte von Deferoxaminmesilat und Ferrioxamin E auf die Menge exprimierter AAH in der stationären Wachstumsphase unterschieden sich. Während in Anwesenheit von Deferoxaminmesylat etwas weniger AAH als in der Kontrolle gebildet wurde, wurde in Anwesenheit von Ferrioxamin E mindestens genauso viel AAH wie in der Kontrolle exprimiert. Dieser Unterschied mag darin begründet sein, dass es sich bei Deferoxaminmesilat um ein eisenfreies Siderophor handelt, während Ferrioxamin E bei Zugabe bereits mit Eisen (Fe^{3+}) beladen war. Eine andere Möglichkeit ist, dass *M. arborescens* Ferrioxamin E besser oder schneller aufnehmen kann als Deferoxaminmesylat.

Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass AAH mit Siderophoren induziert wird. Vermutlich geschieht dies aufgrund der dauerhaft hohen Fe^{2+} Konzentration in der Zelle, welche durch Siderophoraufnahme verursacht wird.

FeSO₄ (Fe^{2+}) induziert AAH-Expression kurzzeitig

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Fe^{2+} über Siderophore die AAH-Expression induziert, sollte nun direkt der Effekt durch Eisenzugabe geprüft werden.

Abbildung 33 zeigt, dass die Gabe von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in der exponentiellen Wachstumsphase zunächst den gleichen Effekt wie ein Siderophor hatte. Auch hier wurde bereits 15 min nach Eisenzugabe AAH-Expression sichtbar.

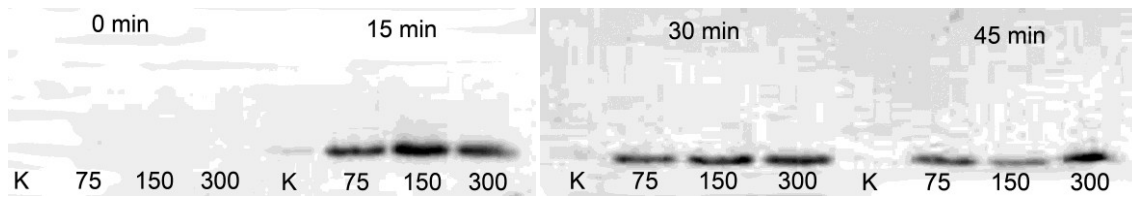


Abbildung 33. Western Blot-Analyse von *M. arborescens* Se 14. Untersucht wurde die AAH-Expression kurz nach Zugabe von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75-300 μM) in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD_{600} eingestellt. K = Kontrolle ca. 15 μM Fe.

Allerdings war dieser Effekt nur vorübergehend. Dies zeigte sich, als *M. arborescens* Se 14 über 24 h in BHI-Medium kultiviert wurde, welches mit verschiedenen FeSO_4 -Konzentrationen angereichert war (Abbildung 34). Diese Langzeitexperimente zeigten, dass AAH nicht während der kompletten exponentiellen Wachstumsphase exprimiert wurde, wie bei den Siderophor-Experimenten.

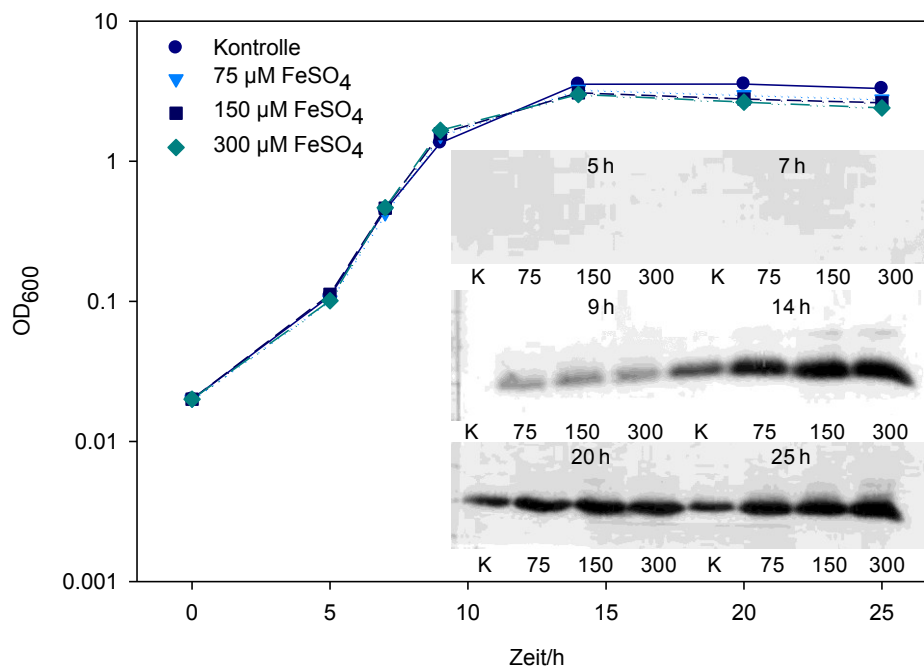


Abbildung 34. Western Blot-Analyse von *M. arborescens* Se 14. Untersucht wurde der Einfluss von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75-300 μM) auf die AAH-Expression über die Wachstumskurve. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die OD_{600} gemessen und die Probe für eine Western Blot-Analyse aufbewahrt. Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD_{600} eingestellt. (K = Kontrolle in BHI-Medium, ca. 15 μM Fe)

Es stellte sich heraus, dass die AAH-Regulation von der Oxidationsstufe des Eisens abhängig war. Die Zugabe von Fe^{3+} als $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ zur exponentiellen Wachstumsphase

bewirkte keine AAH-Expression. Abbildung 35 zeigt, dass nur $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}) die Expression von AAH erhöht.

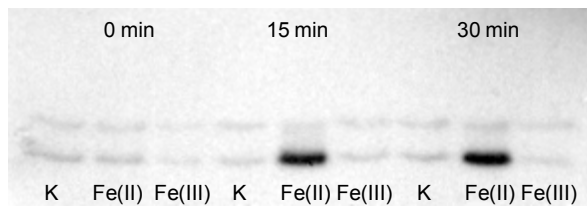


Abbildung 35. Western Blot-Analyse von *M. arborescens* Se 14. Untersucht wurde die AAH-Expression kurz nach der Zugabe von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oder $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (je $300 \mu\text{M}$) in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD_{600} eingestellt. K = Kontrolle ca. $15 \mu\text{M}$ Fe. Die obere Bande ist wahrscheinlich eine unspezifische Hybridisierung.

Abbildung 34 zeigt, dass eine erhöhte Eisenkonzentration zu einer leicht erhöhten AAH-Expression in der stationären Wachstumsphase führte. In der stationären Phase liegt dann vermutlich mehr Fe^{3+} vor, welches vermehrt (durch eigene Siderophore) aufgenommen wird. Dadurch steigt auch die Fe^{2+} -Konzentration in der Zelle an und es wird etwas mehr AAH benötigt.

Zusammengefasst zeigt das Eisen-Experiment, dass AAH vermutlich aufgrund seiner Eisenentgiftungsfunktion bei einer hohen Fe^{2+} -Konzentration kurzzeitig in der Zelle induziert wird. Fe^{2+} wird allmählich zu Fe^{3+} oxidiert und AAH ist für die Entgiftung nicht mehr notwendig. Zusätzliches Fe^{3+} hat keinen Effekt auf die AAH-Expression in der exponentiellen Wachstumsphase.

Eisenchelatoren hemmen die AAH-Expression

Um schließlich den Einfluss von Eisenmangel zu untersuchen, wurde *M. arborescens* Se 14 über 24 h in BHI-Medium mit verschiedenen Eisenchelator-Konzentrationen kultiviert. Es wurden die Chelatoren Bathophenanthrolindisulfonsäure (25 und $50 \mu\text{M}$) und 2,2'-Dipyridyl (150 und $250 \mu\text{M}$) verwendet. In Abbildung 36 wird deutlich, dass in Anwesenheit eines Chelators keine AAH gebildet wird. Die Chelatoren komplexieren Fe^{2+} im Medium und eine AAH-Expression ist nicht notwendig.

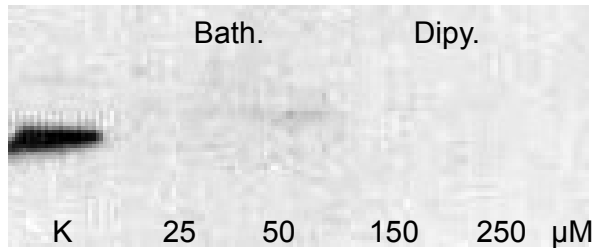


Abbildung 36. Western Blot-Analyse von *M. arborescens* Se 14. Untersucht wurde der Einfluss von Bathopenanthrolindisulfonsäure (Bath., 25 und 50 µM) und 2,2'-Dipyridyl (Dipy., 150 und 250 µM) auf die AAH-Expression. Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt. Probe nach 20 h Wachstum. (K = Kontrolle in BHI-Medium)

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Experimente, dass AAH durch Fe²⁺ reguliert wird. Die Zugabe von FeSO₄ induziert nur kurzfristig AAH, um die reaktive Eisenspezies Fe²⁺ aus dem Medium zu entfernen. Zusätzliche Siderophore im Medium führen zu einer kontinuierlichen AAH-Expression, da die Fe²⁺-Konzentration dauerhaft erhöht ist. Das Gegenteil ist in Anwesenheit eines Chelators der Fall. Ist kein Fe²⁺ vorhanden, wird keine AAH gebildet.

8-HQA, ein Eisenchelator aus dem Darm von Lepidoptera-Larven

Detektion von 8-HQA in Noctuidae-Arten

8-HQA kommt in besonders hoher Konzentration im Regurgitat von *Spodoptera*-Larven vor. In anderen Organismen liegt für diese Substanz bislang kein Nachweis vor. Einzig im Wehrsekret des Schwimmkäfers *I. fenestratus* konnte ein 8-HQA-methylester identifiziert werden⁷⁶. Daher sollten zunächst verschiedene Arten auf 8-HQA untersucht werden. Es standen 13 Lepidoptera-Arten und sieben Coleoptera-Arten zur Verfügung (Tabelle 14). Falls möglich, wurde das Regurgitat untersucht. Ansonsten wurden komplette Tiere mit Methanol homogenisiert und der Extrakt mittels LCMS geprüft. Von den Faltern wurden nur die Larven verwendet. Bei den Käfern wurden sowohl Larven als auch adulte Tiere untersucht.

Wie in Tabelle 14 zusammengefasst, konnte die 8-HQA nur in vier *Spodoptera*-Larven, drei *Heliothis*-Larven und *Orthosia cerasi* detektiert werden. Die anderen fünf Lepidoptera-Arten *Manduca sexta*, *Yponomeuta evonymellus*, *Plutella xylostella*, *Malacosoma* sp. und *Aglais urticae* wiesen keine 8-HQA auf. Auch in den sieben Käferarten konnte diese Substanz nicht gefunden werden. Abbildung 37 zeigt die verwandtschaftlichen Zusammenhänge der verwendeten Lepidoptera-Arten. Die Gattungen *Spodoptera*, *Heliothis* und *O. cerasi* gehören zur Familie der Noctuidae (Eulenfalter). Die anderen Arten gehören jeweils anderen (Über-)Familien an.

Tabelle 14. Auf 8-HQA untersuchte Insektenarten. Dargestellt ist, ob in den untersuchten Arten 8-HQA detektiert werden konnte oder nicht. Wenn die Analyse von Regurgitat nicht möglich war, wurden komplette Tiere mit Methanol extrahiert. Die Gruppierung erfolgt nach Ordnung und Familie.

Keine 8-HQA vorhanden		8-HQA vorhanden
<u>Coleoptera</u>	<u>Lepidoptera</u> ^L	<u>Lepidoptera</u> ^L
Chrysomelidae (Blattkäfer)	Sphingidae (Schwärmer)	Noctuidae (Eulenfalter)
<i>Crioceris asparagi</i> ^{A*}	<i>Manduca sexta</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>Linnaea aenea</i> ^L	Yponomeutidae (Gespinstmotten)	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>Plagiodera versicolora</i> ^L	<i>Yponomeuta evonymellus</i> *	<i>Spodoptera littoralis</i>
<i>Gastrophysa viridula</i> ^{AL}	Plutellidae (Schleier- und Halbmotten)	<i>Spodoptera eridania</i>
<i>Phaedon cochleariae</i> ^{AL}	<i>Plutella xylostella</i>	<i>Heliothis armigera</i>
<i>Epilachna varivestis</i> ^L	Lasiocampidae (Glucken)	<i>Heliothis subflexa</i>
	<i>Malacosoma</i> sp.*	<i>Heliothis virescens</i>
Dytiscidae (Schwimmkäfer)	Nymphalidae (Edelfalter)	<i>Orthosia cerasi</i> *
<i>Agabus</i> sp. ^{A*}	<i>Aglais urticae</i> *	

^LLarven, ^AAdulti, *vorläufige Bestimmung

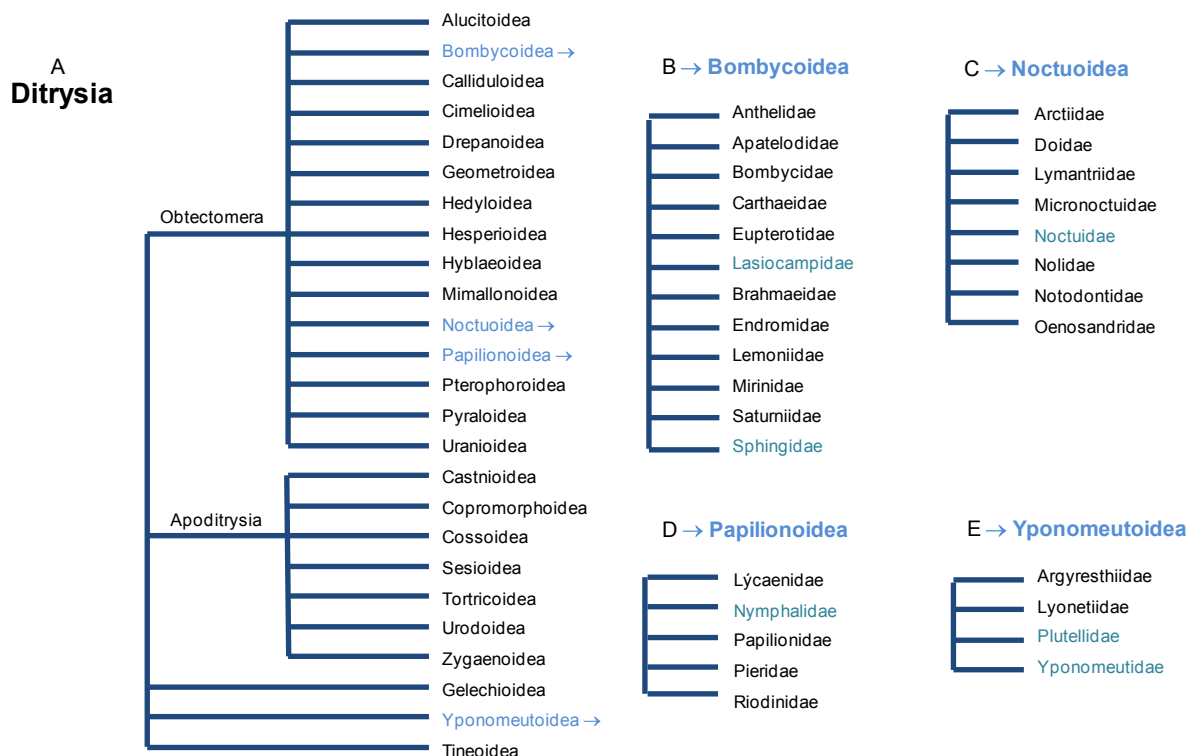


Abbildung 37. (A) Phylogenetischer Baum der Ditrysia, die Gruppe, der die meisten Schmetterlinge und Motten angehören (nach NCBI Taxonomie). Die Spalte rechts bezeichnet die dazugehörigen Überfamilien. **(B)-(E)** Die Überfamilien Bombycoidea, Noctuoidea, Papilionoidea und Yponomeutoidea und ihre entsprechenden Familien. Farblich hervorgehoben sind jeweils die (Über-)Familien, welche in dieser Studie verwendet wurden.

Die Konzentration der 8-HQA im Regurgitat variierte sehr stark. Dennoch konnte man erkennen, dass *S. littoralis* und *S. exigua* die größte Menge im Regurgitat besaß, während die *Heliothis*-Spezies tendenziell geringere Konzentrationen aufwiesen (Abbildung 38).

Die Tatsache, dass die 8-HQA nur in Arten einer Familie gefunden werden konnten, war ein erster Hinweis, dass diese Substanz von der Larve selbst gebildet wird. Es ist nicht wahrscheinlich, dass diese Arten eine spezifische Darmmikrobiota haben. Doch ob Darmbakterien tatsächlich nicht für die 8-HQA-Synthese verantwortlich sein könnten, war noch weiter zu untersuchen.

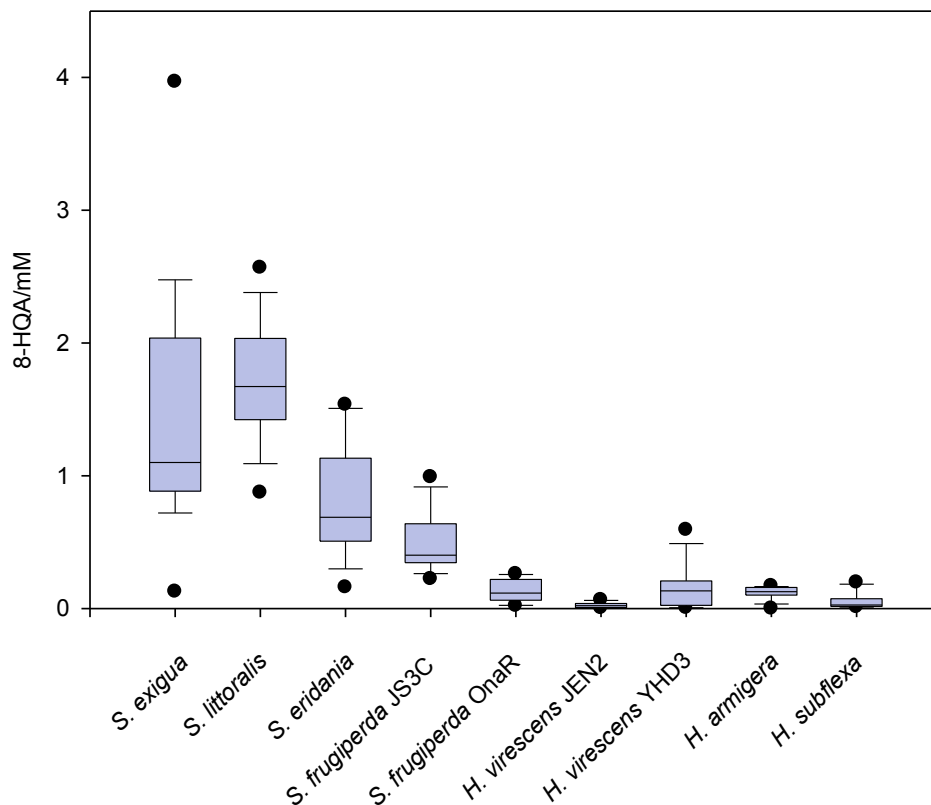


Abbildung 38. Die Konzentration der 8-HQA im Regurgitat verschiedener Lepidoptera-Arten. Von *S. frugiperda* und *H. virescens* standen jeweils zwei verschiedene Populationen zur Verfügung. (n = 6-15)

Antibiotika im Futter haben keinen Einfluss auf die 8-HQA-Synthese

Um die Frage nach dem Ursprung der 8-HQA weiter zu untersuchen, wurde das Futter von *S. littoralis*-Larven mit 5-fach deuteriertem Tryptophan (Trp-d5; Isotec) und Antibiotika versetzt. Tryptophan ist eine bewiesene Vorstufe von 8-HQA und bei Fütterung von

Spodoptera-Larven mit Trp-d5 kann 3-fach deuterierte 8-HQA (8-HQA-d3) im Regurgitat gemessen werden ⁹⁷. Die Deuterierung ermöglichte somit die Quantifizierung von neugebildeter deuterierter 8-HQA (8-HQA-d3) nach der Umstellung auf antibiotikahaltiges Futter. Es wurde ein Gemisch aus vier verschiedenen Antibiotika eingesetzt: Erythromycin, Polymyxin, Tetracyclin und Vancomycin. Diese Mischung ermöglichte sowohl eine bakteriostatische als auch bakterizide Wirkung gegen gramnegative und grampositive Bakterien. Zwei bzw. fünf Tage nach der Umstellung auf Trp-d5/Antibiotika-Futter wurde das Regurgitat der Larven untersucht. Die 8-HQA-d3-Konzentration der Larven auf antibiotikahaltigem Futter wurde mit der von Larven auf normalem Futter verglichen.

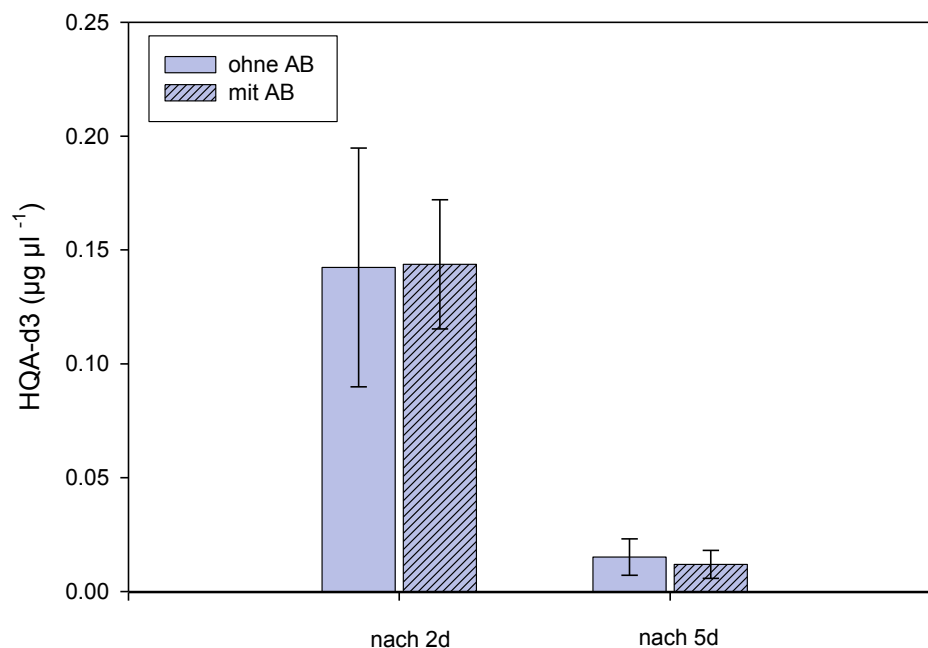


Abbildung 39. Einfluss von Antibiotika auf die 8-HQA-d3-Menge im Regurgitat von *S. littoralis*. Die Larven wurden mit definiertem Minifutter gefüttert, welches mit einem Antibiotika-Gemisch versetzt worden war. Das Regurgitat wurde nach 2 und 5 Tagen entnommen und mittels LCMS analysiert. AB = Antibiotika. (n = 3)

Auf Abbildung 39 ist erkennbar, dass die Antibiotika im Futter keinen Einfluss auf die Menge neugebildeten 8-HQA-d3 haben. Nach zwei bzw. fünf Tagen ist kein Konzentrationsunterschied im Regurgitat der Larven zu erkennen. Das Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die 8-HQA-Synthese nicht von Darmbakterien abhängig ist. Der große Unterschied der 8-HQA-Konzentration zwischen den beiden Messzeitpunkten ist möglicherweise auf das Alter der Larve zurückzuführen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die 8-HQA-Konzentration bei älteren Larven abnimmt ⁹⁷. Bei diesem Experiment wurde ein breites Antibiotikasppektrum verwendet, daher sollte die Wirksamkeit gewährleistet sein. Da allerdings nicht auszuschließen ist, dass Resistenzen im Darm

auftreten, sollte im Folgenden die Wirksamkeit der Antibiotika getestet werden. Dazu wurden Verdünnungsreihen mit dem gesammelten Regurgitat gemacht und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach drei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterienkolonien gezählt.

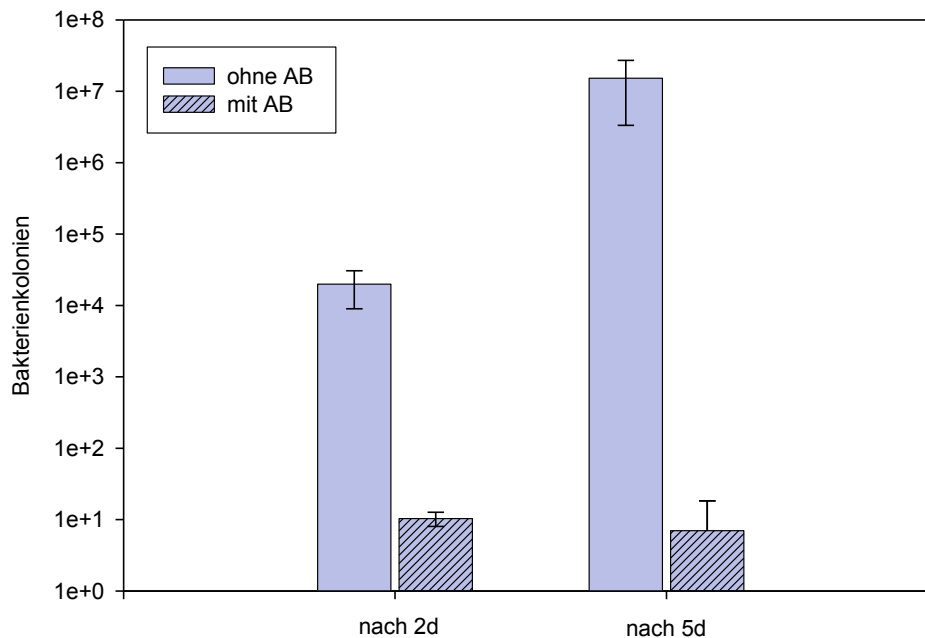


Abbildung 40. Einfluss von Antibiotika auf die Bakterienzahl im Regurgitat von *S. littoralis*. Die Larven wurden mit definiertem Minimalfutter gefüttert, welches mit einem Antibiotika-Gemisch versetzt worden war. Das Regurgitat wurde nach 2 und 5 Tagen untersucht. Zur Bestimmung der Bakterienzahl wurden 10 µl auf LB-Agar ausplattiert. AB = Antibiotika. (n = 3)

Abbildung 40 zeigt, dass die Antibiotika im Futter einen deutlichen Effekt auf die Bakterienzahl im Regurgitat hatten. Nach zwei Tagen fand man 10^4 bis 10^5 Bakterien in 10 µl Regurgitat von Larven, welche auf normalem Futter gefressen hatten. Nach 5 Tagen zählte man dort sogar ca. 10^7 Bakterienkolonien. Im Gegensatz dazu konnte im Regurgitat der Larven, die auf antibiotikahaltigem Futter gefressen hatten nur ca. 10 Kolonien gezählt werden. Dieser deutliche Einbruch zeigt die Wirksamkeit der verwendeten Antibiotika. Die Antibiotika reduzieren deutlich die Bakterienzahl, haben dabei aber keinerlei Einfluss auf die 8-HQA-Konzentration.

Darmbakterien bilden keine 8-HQA

Um herauszufinden, ob Darmbakterien von *Spodoptera*-Larven in der Lage sind, 8-HQA zu bilden, wurden die bereits genannten Se-Stämme (Tabelle 11) getestet. Zusätzlich zu den

Se-Stämmen wurde *E. coli* K12 analysiert, da *E. coli* wahrscheinlich einen großen Anteil an der Darmmikrobiota von *Spodoptera*-Larven hat (Xiaoshu Tang und Liyan Ping, persönliche Mitteilung). Die Stämme wurden 24 h kultiviert und dann Zellen und Wachstumsmedium auf die Anwesenheit von 8-HQA überprüft. In keinem Fall konnte die Substanz nachgewiesen werden. Auch eine Mischung aller Se-Stämme führte nicht zu einer Bildung von 8-HQA. In einem weiteren Experiment wurden die Proteinrohextrakte der Se-Stämme mit Trp-d5 versetzt. Aber auch hier ergaben weder die reinen Extrakte noch eine Mischung aller Se-Stämme eine 8-HQA-d3-Synthese.

Somit war keiner der getesteten Bakterienstämme in der Lage, 8-HQA zu bilden. Da die verwendeten Stämme aber nicht unbedingt die tatsächliche Darmmikrobiota widerspiegeln, wurde isolierter Darm bzw. homogenisierter Darm von *S. littoralis* mit Trp-d5 inkubiert. Bei diesem Experiment wurden ganze Därme verwendet, daher sollte auch der Darminhalt mit der kompletten Darmmikrobiota vorhanden sein. Doch auch in diesem Experiment konnte keine Bildung von 8-HQA-d3 beobachtet werden. Unter den gewählten Bedingungen waren Darmbakterien von *S. littoralis* also nicht in der Lage, 8-HQA herzustellen.

Zusammengefasst kann man sagen, dass es sehr wahrscheinlich ist, dass 8-HQA von der Larve selbst gebildet wird. Gründe für diese Annahme sind das spezifische Auftreten in Noctuidae-Arten, die Tatsache, dass Antibiotika keinen Einfluss auf dessen Synthese in der Larve hatten und dass untersuchte Darmbakterien bzw. die Darmmikrobiota 8-HQA nicht bilden konnten.

Daraus ergibt sich natürlich die Frage, warum *Spodoptera*-Larven 8-HQA in diesen hohen Konzentrationen herstellen.

8-HQA inhibiert bakterielles Wachstum über Eisenkomplexierung

Eine Funktion der 8-HQA könnte sich aus der möglichen antimikrobiellen Wirkung dieser Substanz ergeben, welche für 8-Hydroxychinolinderivate gezeigt werden konnte^{87, 88}. Um die antimikrobielle Wirkung zu überprüfen, wurden verschiedene Bakterienstämme in Anwesenheit von 8-HQA in LB-Medium kultiviert. Zunächst wurden vier Darmbakterienstämme untersucht. Neben den Se-Stämmen *E. mundtii* Se 12, *A. nicotianae* Se 35 und *M. arborescens* Se 14, wurde *E. coli* K12 ausgewählt. *E. coli* und *E. mundtii* machen dabei wahrscheinlich einen großen Anteil an der Darmmikrobiota von *Spodoptera*-Larven aus (Xiaoshu Tang und Liyan Ping, persönliche Mitteilung). *A. nicotianae* Se 35, *M. arborescens* Se 14 und *E. coli* K12 zeigten eine deutliche Inhibierung des Wachstums in Anwesenheit von 8-HQA. Das Wachstum von *E. mundtii* Se 12 war jedoch kaum inhibiert.

Abbildung 41 zeigt beispielhaft die Wachstumskurven von *M. arborescens* Se 14 und *E. mundtii* Se 12.

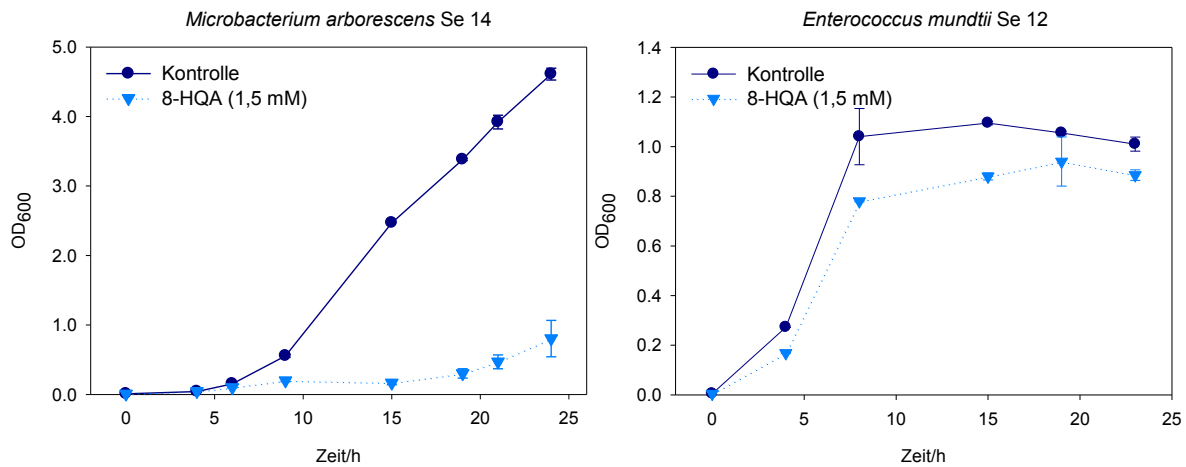


Abbildung 41. Wachstumskurven von *M. arborescens* Se 14 und *E. mundtii* Se 12 in Anwesenheit von 1,5 mM 8-HQA im Nährmedium. Kontrolle in LB-Medium. (n = 2)

Neben den Arten, welche wahrscheinlich zur normalen Mikrobiota des Darms gehören, wurden nun auch pathogene Bakterien untersucht. Es sollte geprüft werden, ob 8-HQA eine Rolle in der Pathogen-Abwehr spielen könnte. Dabei wurden die insektenpathogenen Arten *Xenorhabdus nematophila*, *Serratia entomophila*, *Bacillus thuringiensis* und *Lysinibacillus sphaericus* ausgewählt. *X. nematophila* besiedelt den Darm von *Steinernema carpocapsae* Nematoden, welche in die Hämolymphe von Insektenlarven eindringen¹¹⁷. Dort entlassen sie die Bakterien, welche durch die Sekretion von Enzymen das befallene Insekt zersetzen. Die Freisetzung von Nährstoffen ermöglicht die Ernährung der Nematoden. *S. entomophila* ist ein Pathogen des Engerlings *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae)¹¹⁸. Das Bakterium wird mit der Nahrung aufgenommen und verursacht erst nach einiger Zeit im Darm eine Infektion in dem Insekt. *B. thuringiensis* ist ein insektenpathogenes Bodenbakterium, welches während der Sporenbildung ein kristallines Toxin ausbildet¹¹⁸. Im Darm wird der Kristall gelöst und das Toxin durch Darmenzyme aktiviert. Das Toxin führt zu einer Porenbildung in der Darmwand und schließlich zu einer Zerstörung des Gewebes. Ähnliches gilt für *L. sphaericus*, dessen Toxine vor allem gegen Stechmückenlarven wirken¹¹⁹. *X. nematophila*, *B. thuringiensis* und *L. sphaericus* zeigten in Anwesenheit von 1,5 mM 8-HQA kaum Wachstum. Damit waren sie sogar noch stärker inhibiert als die Darmbakterienstämme *A. nicotianae* Se 35, *M. arborescens* Se 14 und *E. coli* K12, welche stets ein geringes Wachstum zeigten. Interessanterweise war *S. entomophila* gar nicht beeinflusst von 8-HQA. Abbildung 42 zeigt beispielhaft die Wachstumskurven von *S. entomophila* und *B. thuringiensis*.

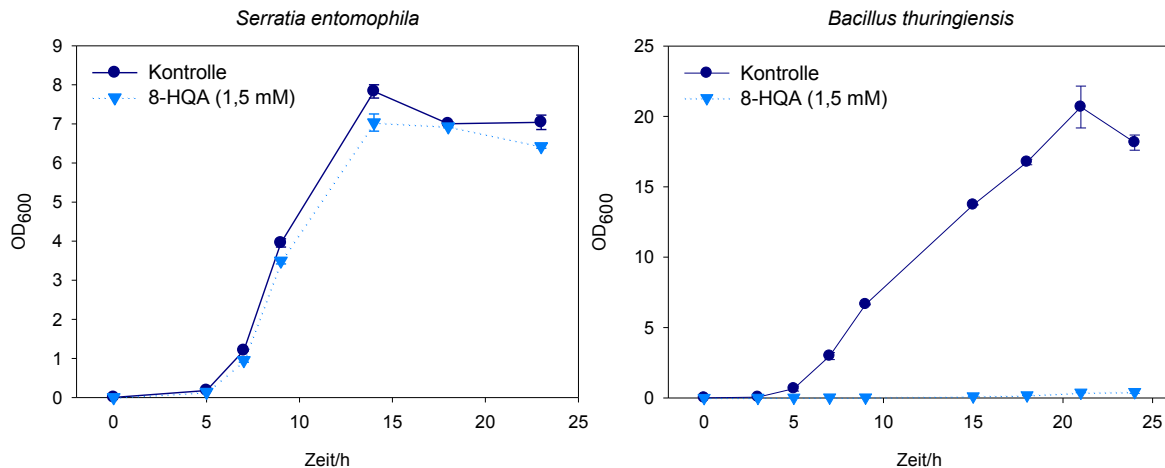


Abbildung 42. Wachstumskurven von *Lysinibacillus sphaericus* und *Bacillus thuringiensis* in Anwesenheit von 1,5 mM 8-HQA im Nährmedium. Kontrolle in LB-Medium. (n = 2)

Desweiteren wurde die Wirkung von 8-HQA auf verschiedene Pilze untersucht. Es sollte geprüft werden, ob 8-HQA eine Rolle in der Pathogen-Abwehr spielen könnte. Dabei wurden die insektenpathogenen Pilze *Cordyceps militaris* (Puppenkernkeule), *Metarhizium anisopliae* und *Beauveria bassiana* und außerdem der pflanzenpathogene Pilz *Fusarium equiseti* überprüft. Nach wenigen Tagen war erkennbar, dass keiner der Pilze durch 8-HQA beeinträchtigt war. Auch mit 8-HQA-versetzter (2 mM) SFM-Agar hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Pilze.

Um direkt den Effekt von Regurgitat auf das Wachstum verschiedener Bakterienstämme zu überprüfen, wurden Agartests durchgeführt. Kulturen von *M. arborescens*, *L. sphaericus* und *B. thuringiensis* wurden verdünnt (10^{-8} , 10^{-7} bzw. 10^{-6}), auf LB-Agar ausplattiert und eine Hälfte der Platte mit sterilem Regurgitat bestrichen. Man konnte beobachten, dass auf der Regurgitat-behandelten Hälfte deutlich weniger Kolonien wuchsen als auf der Kontrollhälfte (Abbildung 43).

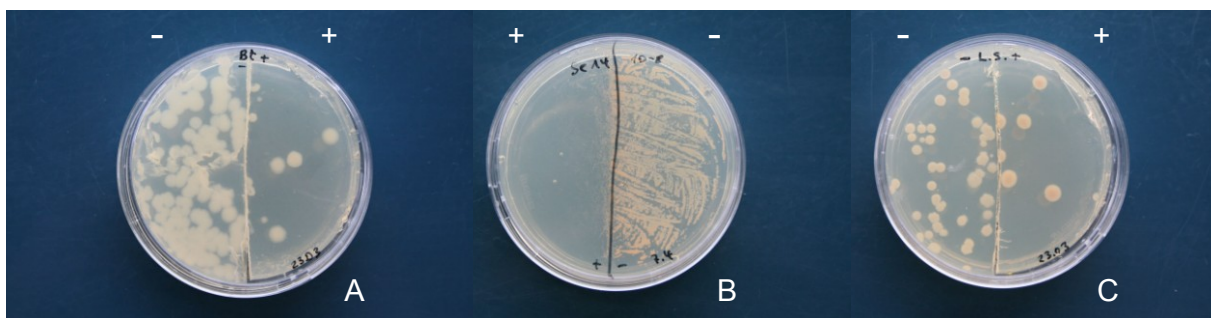


Abbildung 43. Regurgitat-Agartests. Bakterien wurden auf der gesamten Agarplatte ausplattiert und je eine Hälfte mit 100 µl sterilem Regurgitat bestrichen. (+) mit Regurgitat, (-) ohne Regurgitat. (A) *B. thuringiensis*, (B) *M. arborescens* Se 14, (C) *L. sphaericus*.

8-HQA kann bivalente Metallionen, wie z. B. Eisen komplexieren⁹³⁻⁹⁷. Diese Eigenschaft könnte die Ursache für die Wachstumsinhibierung der Bakterienstämme sein, da in Anwesenheit von 8-HQA weniger Eisen bioverfügbar wäre. Um dies zu überprüfen, wurde *E. coli* K12 in Anwesenheit von 8-HQA und $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kultiviert.

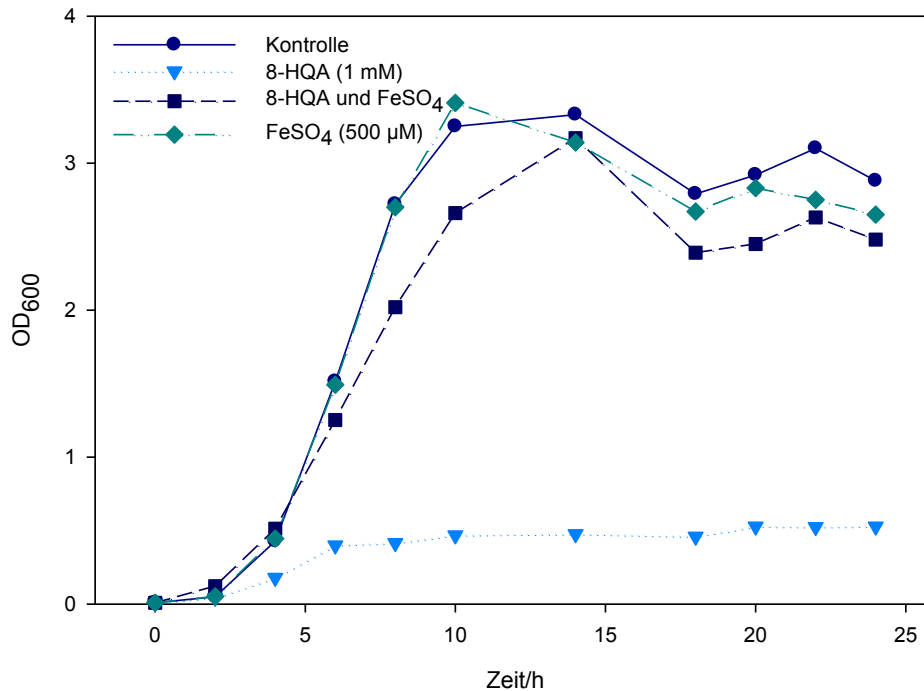


Abbildung 44. Wachstumskurve von *E. coli* K12 in Anwesenheit von 1 mM 8-HQA und/oder 500 µM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ im Nährmedium. Kontrolle in LB-Medium. (n = 1 Der Versuch wurde viermal wiederholt)

Wie auf Abbildung 44 erkennbar, kompensierte das zugesetzte FeSO_4 tatsächlich den hemmenden Effekt der 8-HQA. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die 8-HQA aufgrund ihrer Eigenschaft als Eisenchelator bakterielles Wachstum beeinflusst.

8-HQA inhibiert die Expression des DPS-Proteins AAH, außerdem die Aktivität zweier eisenhaltiger Proteine

Nun sollte auf Proteinebene betrachtet werden, ob die 8-HQA wie ein Eisenchelator wirkt. Zunächst wurde die Proteinexpression des bekannten DPS-Proteins AAH aus *M. arborescens* Se 14 in Anwesenheit von 8-HQA über eine Western Blot-Analyse untersucht. Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass die Expression dieses Proteins von der verfügbaren Eisenkonzentration abhängig ist. Abbildung 45 zeigt, dass auch in Anwesenheit von 8-HQA AAH kaum exprimiert wird. Die 8-HQA zeigt demnach den gleichen Effekt wie einer der anderen Eisenchelatoren.

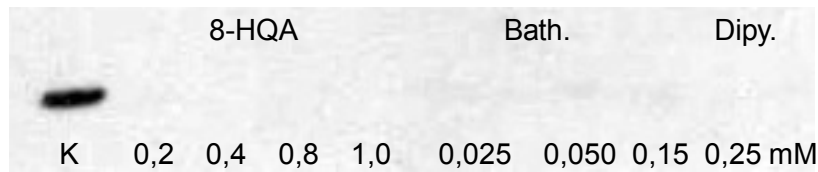


Abbildung 45. Western Blot-Analyse von *M. arborescens* Se 14 mit einem AAH-Antikörper. Untersucht wurde der Einfluss von 8-HQA (0,2-1 mM) Bathophenanthrolindisulfonsäure (0,025-0,050 mM) und 2,2'-Dipyridyl (0,15-0,25 μ M) auf die AAH-Expression. Die Proben wurden vor der Western Blot-Analyse auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt. Probe nach 24 h Wachstum. (K = Kontrolle in BHI-Medium)

M. arborescens macht wahrscheinlich keinen großen Anteil an der Darmmikrobiota von *Spodoptera*-Larven aus. Daher sollten im Folgenden Proteine aus *E. coli* untersucht werden. Dazu wurde die Enzymaktivität verschiedener eisenregulierter Enzyme unter dem Einfluss der 8-HQA untersucht. *E. coli* K12 wurde in Anwesenheit von FeSO₄, 8-HQA und eines weiteren Eisenchelators (2,2'-Dipyridyl) für 24 h in LB-Medium kultiviert. Der Proteinrohextrakt wurde anschließend in einem nativen PA-Gel separiert. Die Aktivität verschiedener Enzyme konnte im Gel qualitativ bestimmt werden. Dazu wurden die Cytochromoxidase und die Superoxiddismutase gewählt, da von diesen Enzymen bekannt ist, dass sie in *E. coli* über Eisen reguliert werden^{48, 71}.

Die Cytochromoxidase ist der terminale Elektronenakzeptor in der Atmungskette und kommt bei allen aeroben Organismen vor. *E. coli* hat zwei Cytochromoxidasen, die Cytochrom-o-Oxidase (133 kDa) und die Cytochrom-d-Oxidase (101 kDa), welche beide Häm-abhängig sind¹²⁰. Der Aktivitätsassay basiert auf der Fähigkeit von Cytochromoxidasen, dass sie die eingesetzten Substrate α -Naphthol und *N,N*-Dimethyl-p-phenylenediamine zu einem blauen Farbstoff, dem Indophenolblau verbinden können¹¹². In Abbildung 46 erkennt man in der Kontrolle und der FeSO₄-behandelten Probe unterhalb der Markerbande von 140 kDa zwei dunkelblaue Banden, welche Cytochromoxidase-Aktivität indizieren. Diese Banden wurden in Anwesenheit von 8-HQA stark reduziert. 2,2'-Dipyridyl hatte einen ähnlichen Einfluss. Wahrscheinlich durch fehlendes Eisen verringerte sich hier deutlich die Aktivität des Enzyms. Durch die Zugabe von sowohl 8-HQA als auch FeSO₄ wurde dieser Effekt zumindest teilweise kompensiert. Die schwächere Bande, welche in allen Proben bei ca. 300 kDa auftrat, ist wahrscheinlich eine unspezifische Reaktion.

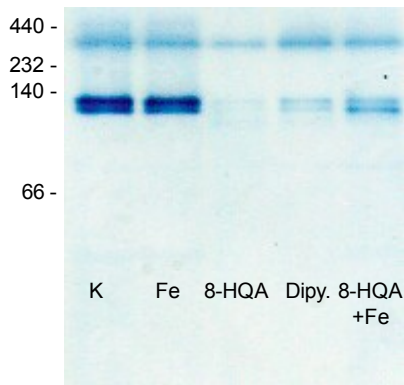


Abbildung 46. In-Gel-Enzymassay für Cytochromoxidasen. *E. coli* wurde in Anwesenheit von 500 μM FeSO_4 , 1 mM 8-HQA oder 200 μM 2,2'-Dipyridyl kultiviert. Es wurden 10 μg Gesamtprotein je Proben tasche aufgetragen, in einem nativen PA-Gel getrennt und mit der spezifischen Färbelösung behandelt. K = Kontrolle in LB-Medium. Ein Proteinmarker wurde mit aufgetragen, die Ziffern links zeigen die Größe in kDa.

Superoxiddismutasen sind Metalloproteine, welche Eisen oder andere Metalle wie Kupfer, Zink, Mangan oder Nickel enthalten. Sie wandeln die sehr reaktiven Superoxid-Anionen in H_2O_2 um. Da Superoxide sowohl Proteine als auch DNA zerstören, sind Superoxiddismutasen wichtige Enzyme für alle aeroben Organismen. *E. coli* besitzt drei Formen: eine Mn- (46 kDa), eine Fe- (42 kDa) und eine Cu-Zn-Superoxiddismutase (17 kDa) ¹²².

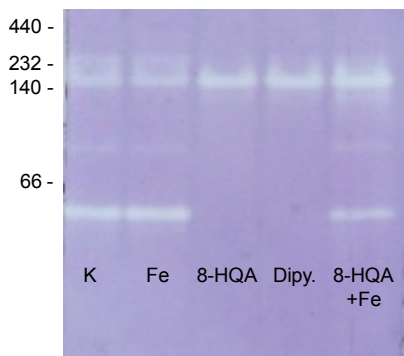


Abbildung 47. In-Gel-Enzymassay für Superoxiddismutasen. *E. coli* wurde in Anwesenheit von 500 μM FeSO_4 , 1 mM 8-HQA oder 200 μM 2,2'-Dipyridyl kultiviert. Es wurden 10 μg Gesamtprotein je Proben tasche aufgetragen, in einem nativen PA-Gel getrennt und mit der spezifischen Färbelösung behandelt. K = Kontrolle in LB-Medium. Ein Proteinmarker wurde mit aufgetragen, die Ziffern links zeigen die Größe in kDa.

Im Aktivitätstest wurden MTT und PMS eingesetzt. Das hellgelbe MTT wird im Tageslicht mit Hilfe von PMS zu blauem Formazan reduziert. Superoxiddismutasen hingegen katalysieren die Rückreaktion, das heißt die Oxidation zu gelbem MTT. Somit erhält man ein blaues Gel, in dem die Aktivität von Superoxiddismutasen durch hellgelbe Banden indiziert wird ¹¹². Auf Abbildung 47 erkennt man unterhalb der Markerbande von 66 kDa in der Kontrolle und der FeSO_4 -behandelten Probe eine solche helle Bande. Vermutlich zeigt diese die Aktivität von sowohl der Mn- als auch der Fe-Superoxiddismutase an. Diese Banden verschwanden in der Probe, welche mit 8-HQA oder 2,2'-Dipyridyl behandelt wurden. Wahrscheinlich verringert sich hier deutlich die Aktivität des Enzyms durch fehlendes Eisen. Durch die Zugabe von 8-HQA und FeSO_4 wurde dieser Effekt vollständig kompensiert. Die Bande, die in allen Proben bei ca. 200 kDa auftrat, ist wahrscheinlich eine unspezifische Reaktion.

Wie erwartet, inhibiert die 8-HQA somit sowohl die Expression von AAH aus *M. arborescens* Se 14 als auch die Aktivität zweier anderer bakterieller eisenhaltiger Enzyme. Durch das fehlende Eisen können zahlreiche Stoffwechselfunktionen nicht mehr optimal ablaufen und das Wachstum ist gehemmt. Dies könnte ein Hinweis auf eine Aufgabe der 8-HQA sein. Möglicherweise hat diese Substanz eine antibakterielle Wirkung, um das Wachstum potentiell pathogener Mikroorganismen im Darm einzudämmen. Von Vertebraten ist eine solche sogenannte Eisenrückhaltestrategie bekannt. In Blut, Milch oder Eiern wird die Eisenkonzentration niedrig gehalten, um bakterielles Wachstum zu verhindern. Vertebraten nutzen dazu eisenbindende Proteine mit Transport- (Transferrin) und Speicherfunktion (Ferritin).

8-HQA wird nicht über Eisen im Futter reguliert

Da die 8-HQA im Darm möglicherweise als Eisenchelator wirkt, sollte nun geprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Eisenkonzentration im Futter und der 8-HQA-Konzentration im Darm gibt. Dem undefinierten Futter von *S. littoralis*-Larven wurden daher Eisenchelatoren in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt (Bathophenanthrolin-disulfonsäure: 0,15-15 mM und 2,2'-Dipyridyl: 0,15-1,5 mM). Nach ein bis drei Tagen wurde die 8-HQA-Konzentration im Regurgitat bestimmt. Hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Larven, die auf dem Chelator-Futter gefressen hatten und der Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt). Auch in einem weiteren Experiment bei dem *S. littoralis*-Larven mehrere Tage mit definiertem Futter gefüttert wurden, welches unterschiedliche FeSO_4 -Konzentrationen enthielt, konnten keine deutlichen Unterschiede in der 8-HQA-Konzentration im Regurgitat festgestellt werden. Dies ist auf Abbildung 48 erkennbar, dort sieht man, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Larven gibt, die auf eisenfreiem Futter gefressen hatten und den Larven, die auf 1 mM FeSO_4 -Futter gefressen hatten. Man erkennt lediglich, dass eine sehr hohe Eisenkonzentration im Futter (10 mM FeSO_4) zu einer leicht verringerten 8-HQA-Konzentration im Regurgitat führt. Dies ist aber wahrscheinlich ein Nebeneffekt, resultierend aus dem möglicherweise etwas schlechteren Allgemeinzustand der Larven durch eine hohe Eisenkonzentration im Futter.

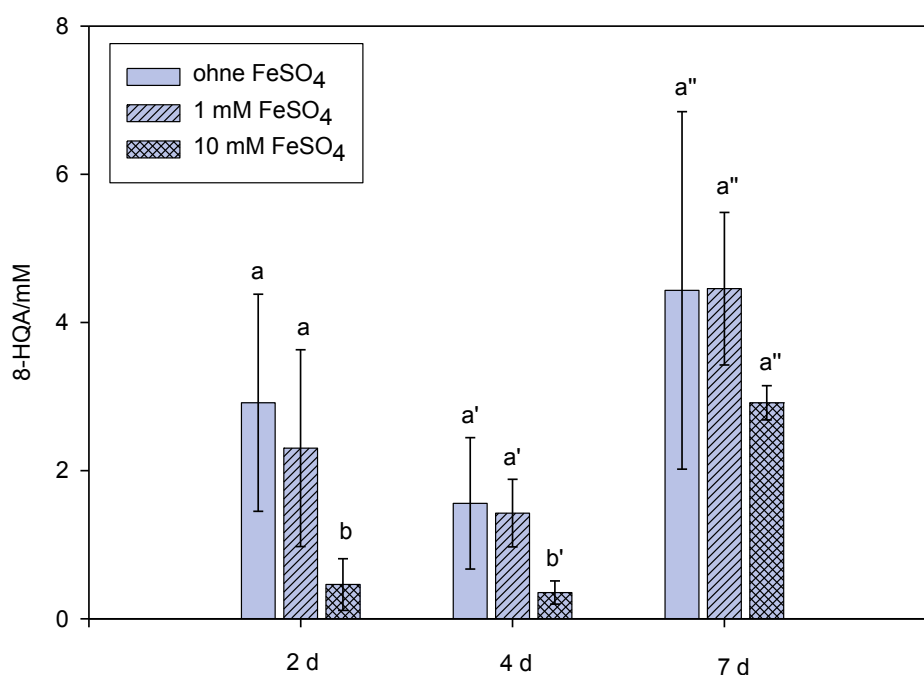


Abbildung 48. 8-HQA-Konzentration im Regurgitat in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration im Futter. Die 8-HQA-Konzentration wurde zwei bis sieben Tage nach dem Futterwechsel von undefiniertem Futter auf definiertes Minimalfutter verschiedenen Eisengehaltes gemessen. Unterschiedliche Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede innerhalb eines Messzeitpunktes ($p < 0,05$; ANOVA mit Fishers LSD-Test; $n = 4-6$).

Somit kann festgestellt werden, dass die 8-HQA in der Larve nicht über Eisen reguliert wird. Es scheint ständig eine große 8-HQA-Konzentration im Darm vorhanden zu sein, völlig unabhängig von der Eisenkonzentration.

Schließlich wurde die Eisenkonzentration im Regurgitat bestimmt. Dazu wurden Larven verwendet, welche auf definiertem Minimalfutter (1 mM FeSO₄) gefressen hatten. Die Eisenkonzentration ergab einen relativ niedrigen Wert von $1,87 \pm 0,59 \mu\text{M}$ ($n = 3$). Da dieser Wert nach Ultrafiltration (kleiner als 3 kDa) bestimmt wurde, ließ sich daraus schließen, dass der Großteil des aufgenommenen Eisens im Darm wahrscheinlich in Eisenspeicherproteinen gebunden und möglicherweise weiter transportiert wurde. In den Proben, die für die Eisenbestimmung verwendet wurden, ließ sich außerdem die 8-HQA-Konzentration bestimmen. Auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen der 8-HQA-Konzentration und Eisenkonzentration festgestellt werden (Tabelle 15).

Tabelle 15. Vergleich der Eisen- und 8-HQA-Konzentration von drei Regurgitatproben

Nr.	Eisenkonzentration	8-HQA-Konzentration
1	2,16 μM	0,17 mM
2	1,20 μM	0,58 mM
3	2,26 μM	5,39 mM

8-HQA wird kontinuierlich gebildet und zum größten Teil ausgeschieden

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass die 8-HQA aus dem Tryptophanmetabolismus stammt⁹⁷. Nun sollte die Frage beantwortet werden, ob die 8-HQA über die Tryptophan-Konzentration im Futter reguliert wird. Gleichzeitig sollte geklärt werden, ob diese Substanz kontinuierlich aus Tryptophan neu synthetisiert wird oder ob es zu einer Rezyklierung im Körper kommt.

Die Menge der 8-HQA im Kot ist mit $2,45 \pm 1,03$ nmol/mg recht hoch. Dass eine große Menge 8-HQA ständig ausgeschieden wird, spricht für eine kontinuierliche Produktion dieser Substanz. Um herauszufinden, ob die 8-HQA tatsächlich ständig neu aus Tryptophan synthetisiert wird, wurden *S. littoralis*-Larven mit definiertem Minimalfutter verschiedener Tryptophankonzentration gefüttert. Aus Abbildung 49 wird deutlich, dass die 8-HQA-Konzentration im Regurgitat sehr stark von der Tryptophan-Konzentration im Futter abhängig ist. Drei Tage nach der Umstellung von undefiniertem Kunstfutter auf tryptophanfreies Minimalfutter war die 8-HQA-Konzentration auf $0,1 \pm 0,07$ mM gesunken. Gleichzeitig war die 8-HQA-Konzentration auf $10,4 \pm 2,2$ mM im Regurgitat der Larven angestiegen, die auf sehr tryptophanreichem (19,5 mmol/g) Futter gefressen hatten (Abbildung 49).

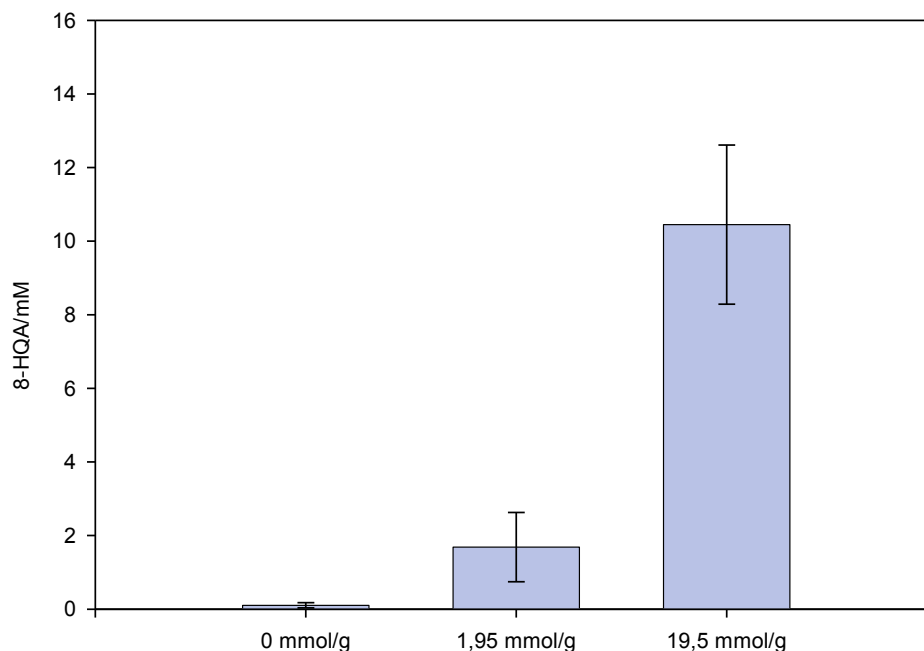


Abbildung 49. 8-HQA-Konzentration im Regurgitat in Abhängigkeit von der Tryptophan-Konzentration im Futter. Die 8-HQA-Konzentration wurde drei Tage nach dem Futterwechsel von undefiniertem Futter auf definiertes Minimalfutter verschiedenen Tryptophangehalts gemessen. (n = 5)

Die 8-HQA wird demnach kontinuierlich aus Tryptophan synthetisiert. Um zu prüfen, ob neu gebildete 8-HQA vollständig ausgeschieden wird, wurde 2-fach deuterierte 8-HQA (8-HQA-d2) gefüttert.

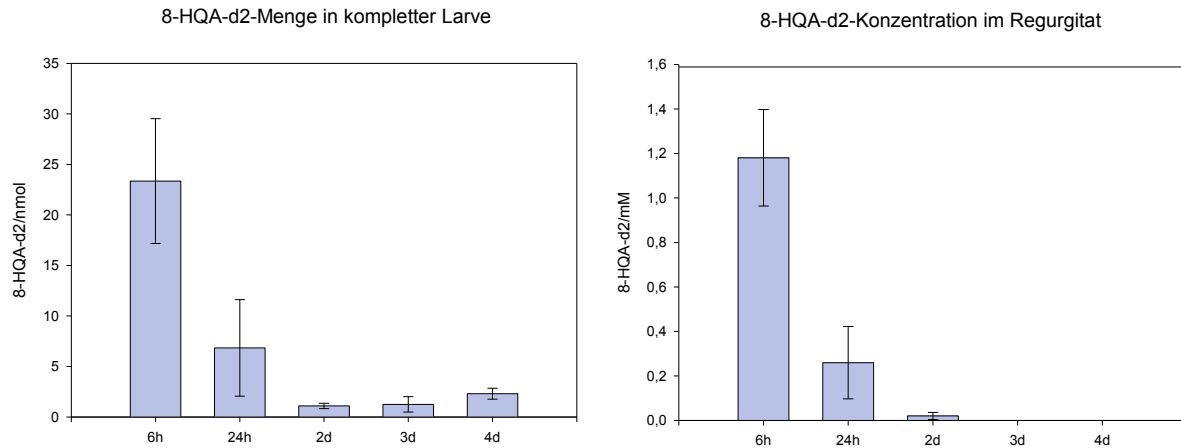


Abbildung 50. 8-HQA-d2-Menge in der kompletten Larve und 8-HQA-d2-Konzentration im Regurgitat 6 h bis 4 Tage nach Fütterung von 10 µg (52 nmol) 8-HQA-d2. Zu jedem Zeitpunkt wurde in der kompletten Larve bzw. im Regurgitat die 8-HQA-d2 Menge mittels LCMS quantifiziert. (n = 5-6)

In Abbildung 50 ist erkennbar, dass die 8-HQA-d2-Konzentration im Regurgitat sehr deutlich abnahm und nach drei Tagen keine 8-HQA-d2 mehr gemessen werden konnte. In der kompletten Larve hingegen konnte auch vier Tage nach Fütterung noch 8-HQA-d2 festgestellt werden. Demnach wird die 8-HQA zum größten Teil direkt ausgeschieden und nur ein sehr kleiner Teil verbleibt über einige Tage im Darm oder im Gewebe.

Um zu klären, welcher Anteil des Tryptophans in 8-HQA umgewandelt wird, wurden exakt 10 µg (47,8 nmol) 5-fach deuterierten Tryptophans gefüttert. Abbildung 51 zeigt die Menge 3-fach deuterierter 8-HQA in der Larve und im Kot 24 h später. Aus der Gesamtmenge 3-fach deuterierter 8-HQA ergibt sich, dass nach 24 h $10,2 \pm 6,2\%$ des gefütterten Tryptophans in 8-HQA umgewandelt worden waren.

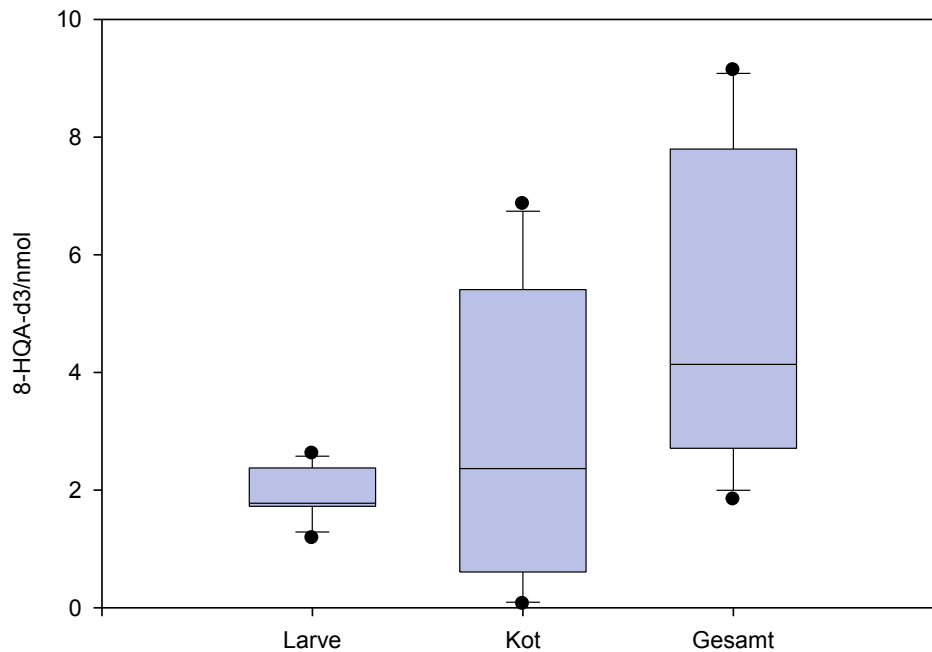


Abbildung 51. 8-HQA-d3-Menge in der Larve und im Kot 24 h nach der Fütterung von 10 µg (47,8 nmol) Tryptophan-d5. Larve und Kot wurden jeweils mit Methanol homogenisiert und der Überstand mittels LCMS analysiert. (n = 7)

Zusammengefasst kann man sagen, dass ca. 10% des Tryptophans in der Nahrung ständig neu in 8-HQA umgewandelt und anschließend zum größten Teil ausgeschieden wird.

Syntheseweg von 8-HQA

8-HQA wird aus dem durch die Nahrung aufgenommenen Tryptophan gebildet, doch die Zwischenschritte sind bislang noch unklar. In der Literatur findet man zwei Synthesewege, welche auf die 8-HQA übertragen werden könnten. Wie in der Einleitung beschrieben, ist für *D. melanogaster* die Biosynthese der Xanthurensäure nachgewiesen⁹, welche über Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin erfolgt (Abbildung 10). Außerdem ist aus dem marinen Actinomycet *Micromonospora* sp. ein Biosyntheseweg für 3-HQA über Kynurenin, Kynurensäure und Chinaldinsäure bekannt⁸⁵ (Abbildung 11). Um Hinweise auf den richtigen Biosyntheseweg zu erhalten, wurden *S. littoralis*-Larven für zwei Tage mit Tryptophan-freiem Futter gefüttert, das mit möglichen Vorstufen versetzt war (L-Tryptophan, L-Kynurenin, 3-Hydroxy-DL-kynurenin, Xanthurensäure, Kynurensäure und Chinaldinsäure). Anschließend wurde die 8-HQA-Menge quantifiziert.

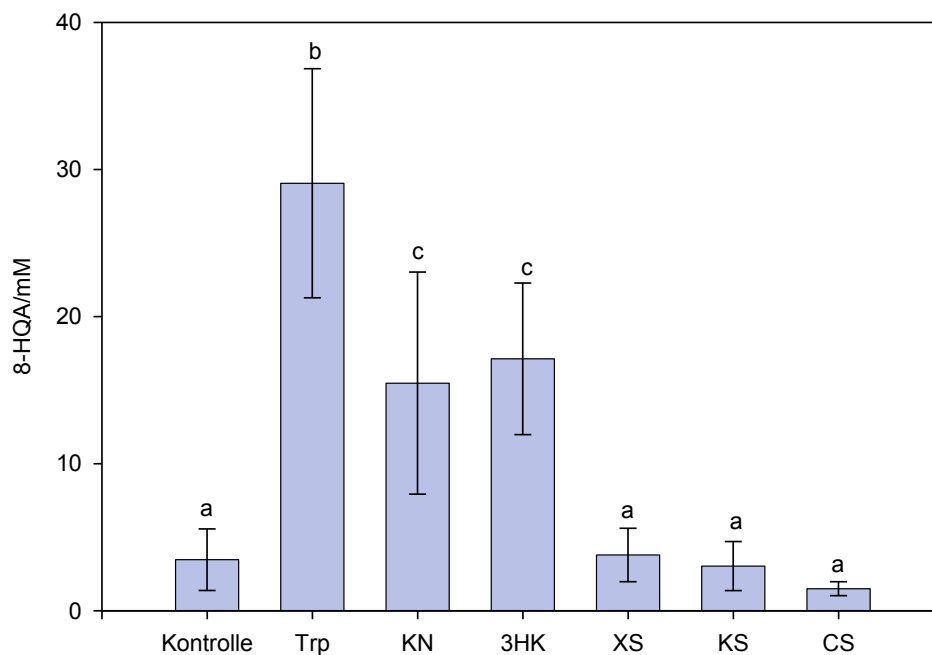


Abbildung 52. Konzentration 8-HQA im Regurgitat von *S. littoralis*. Die Larven fraßen zwei Tage auf Tryptophan-freiem Futter, welches mit ca. 10 mg ml^{-1} verschiedener möglicher 8-HQA-Vorstufen versetzt war. Kontrolle: ohne Zusatz, Trp: L-Tryptophan, KN: L-Kynurenin, 3HK: 3-Hydroxy-DL-kynurenin, XS: Xanthurensäure, KS: Kynurensäure, CS: Chinaldinsäure. (Unterschiedliche Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; ANOVA mit Fishers LSD-Test; $n = 5$).

Wie in Abbildung 52 erkennbar, bewirkten L-Tryptophan, L-Kynurenin und 3-Hydroxy-DL-kynurenin im Futter im Vergleich zur Kontrolle einen Anstieg der 8-HQA-Konzentration. Diese Substanzen konnten demnach als Vorstufe verwendet werden. Die Anwesenheit von Xanthurensäure, Kynurensäure und Chinaldinsäure hingegen hatte keinen Einfluss auf die 8-HQA-Konzentration und waren daher vermutlich keine Vorstufen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass 8-HQA ähnlich wie die Xanthurensäure über Tryptophan, Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin gebildet wird. Xanthurensäure selbst schien aber keine Vorstufe zu sein. Um dieses Ergebnis abzusichern, wurden anschließend deuterierte Vorstufen an die Larve verfüttert. Es standen 3-fach deuteriertes 3-Hydroxy-DL-kynurenin (3HK-d3), 3-fach deuterierte Xanthurensäure (XS-d3) und 1-fach deuterierte Kynurensäure (KS-d1) zur Verfügung (Abbildung 53). Von diesen Komponenten wurden jeweils $70 \mu\text{g}$ (313, 341 bzw. 368 nmol) je Larve gefüttert und nach 3 h das Regurgitat untersucht. Wurde 3HK-d3 gefüttert, konnte im Regurgitat 8-HQA-d2 nachgewiesen werden (Abbildung 54). Wurde XS-d3 oder KS-d1 gefüttert, war dies nicht der Fall.

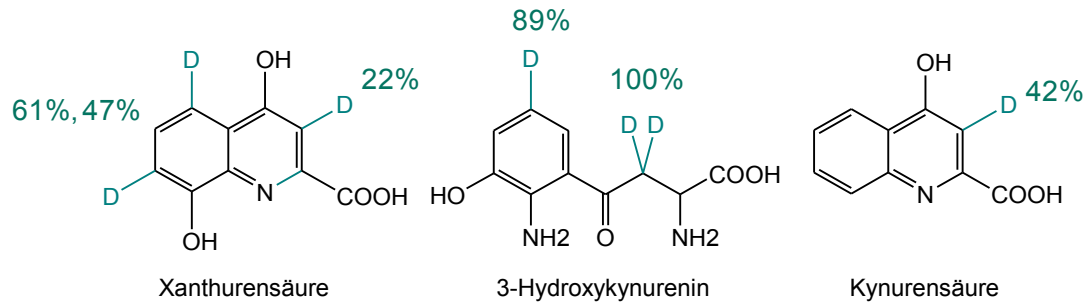


Abbildung 53. Deuterierte potentielle Vorstufen von 8-HQA: Xanthurensäure, 3-Hydroxykynurenin und Kynurensäure. Die Zahlen zeigen den Deuterierungsgrad der jeweiligen Position an.

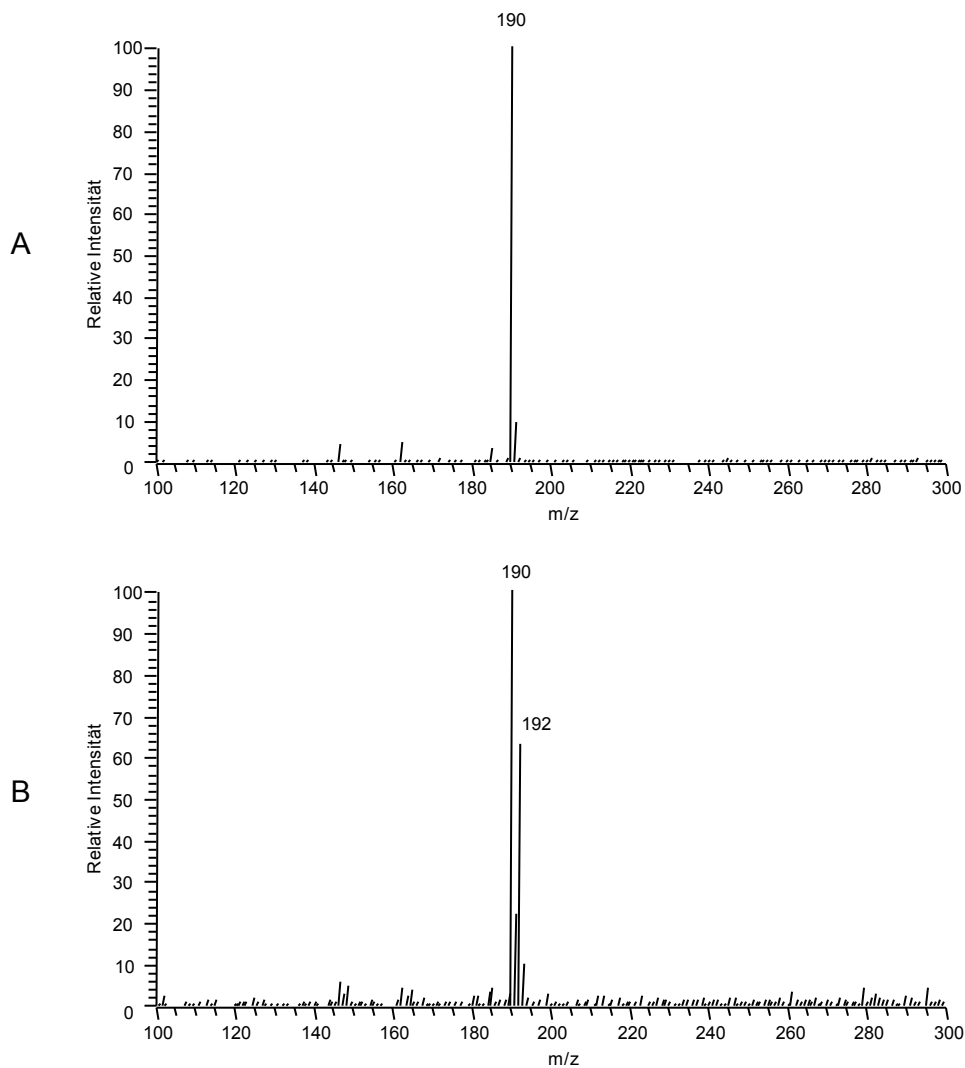


Abbildung 54. MS-Spektren von Regurgitat. Dargestellt ist das Fragmentierungsmuster von 8-HQA. **(A)** Kontrolle mit Wasser. **(B)** Spektrum nach Fütterung von deuteriertem 3-Hydroxy-DL-kynurenin (3HK-d3). Es ist erkennbar, dass nach der Fütterung von 3HK-d3 ein Peak der Masse 192 auftritt, bei dem es sich um 2-fach deuterierte 8-HQA handelt.

Dies bestätigte 3-Hydroxykynurenin als Vorstufe und zeigte, dass Xanthurensäure nicht als Vorstufe verwendet werden kann. Abbildung 55 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Fütterungsexperimente.

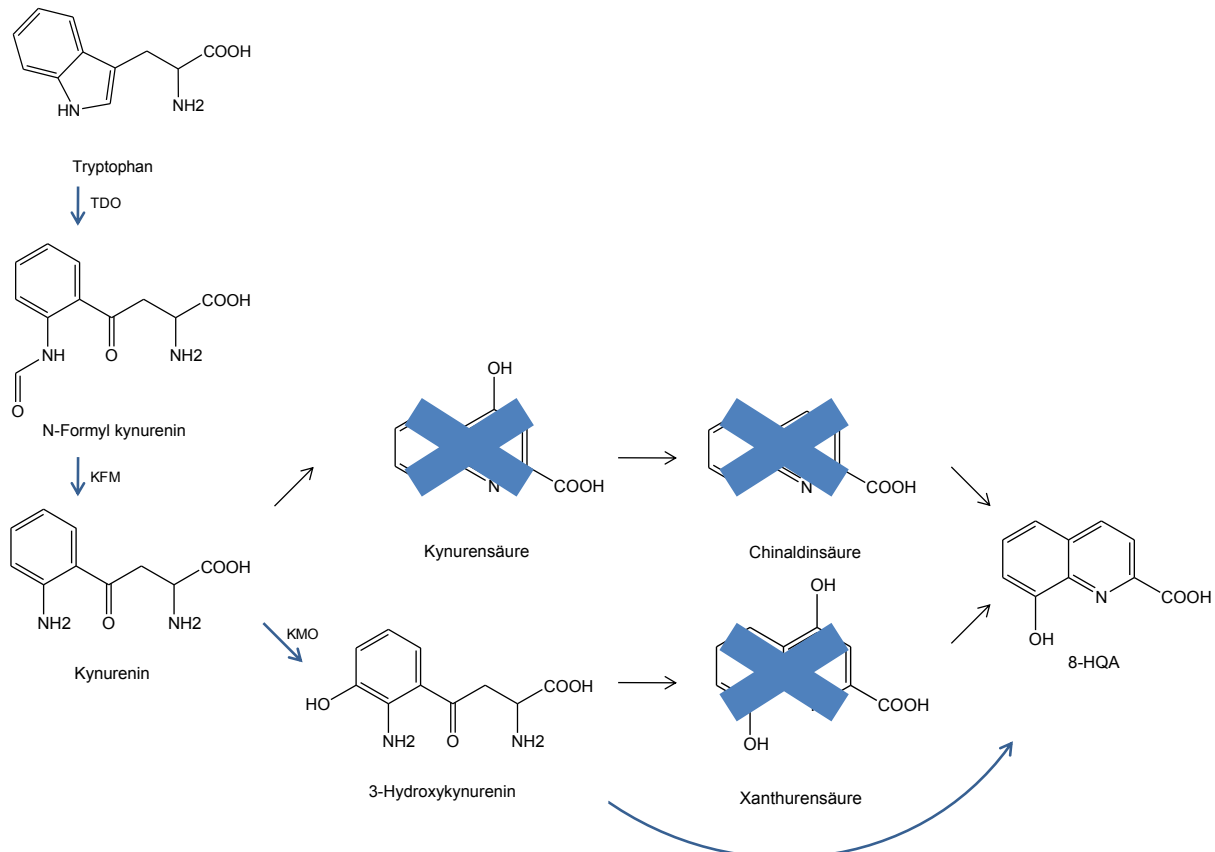


Abbildung 55. Biosynthetische Schritte für 8-HQA aus Tryptophan. Die Vorstufen wurden wie im Text beschrieben getestet. Tryptophan, Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin wurden als 8-HQA-Vorstufen bestätigt. Xanthurensäure, Kynurensäure und wahrscheinlich Chinaldinsäure waren hingegen keine 8-HQA-Vorstufen. TDO = Tryptophandioxygenase, KFM = Kynureninformamidase, KMO = Kynureninmonooxygenase.

Die letzten Schritte zwischen 3-Hydroxykynurenin und 8-HQA wurden bislang nicht beschrieben. Abbildung 56 fasst die möglichen Biosyntheseschritte zusammen. Der erste Schritt ist wahrscheinlich die Reduktion der Carbonylgruppe (Zweig 1 und 2). Im Massenspektrum des Regurgitats nach Fütterung von 3HK-d3 (Abbildung 54.B) lag nur undeuterte 8-HQA (m/z 190) und eine 2-fach deutierte Form der 8-HQA (m/z 192) vor. Eine 1-fach oder 3-fach deutierte Form war nicht erkennbar. Das Deuterium an Position 5 im Ring des 3-Hydroxykynurenins erwies sich bereits in Fütterungsexperimenten mit Trp-d5 als stabil. Es bleibt also immer ein Deuterium der Seitenkette erhalten. Dies ist nur der Fall wenn die benachbarte Carbonylgruppe schnell reduziert wird. Würde zunächst eine Transaminase-Reaktion stattfinden (Zweig 3), müssten aufgrund von Keto-Enol-Tautomerie beide Deuterium-Atome verloren gehen. Nach der Reduktion sollte die Hydroxylgruppe unter Eliminierung von HDO abgespalten werden. Anschließend sollte sich eine Transaminase-

Reaktion, welche zu einem spontanen Ringschluss führt. In welcher Reihenfolge diese beiden letzten Schritte stattfinden ist allerdings nicht zu entscheiden (Zweige 1 oder 2).

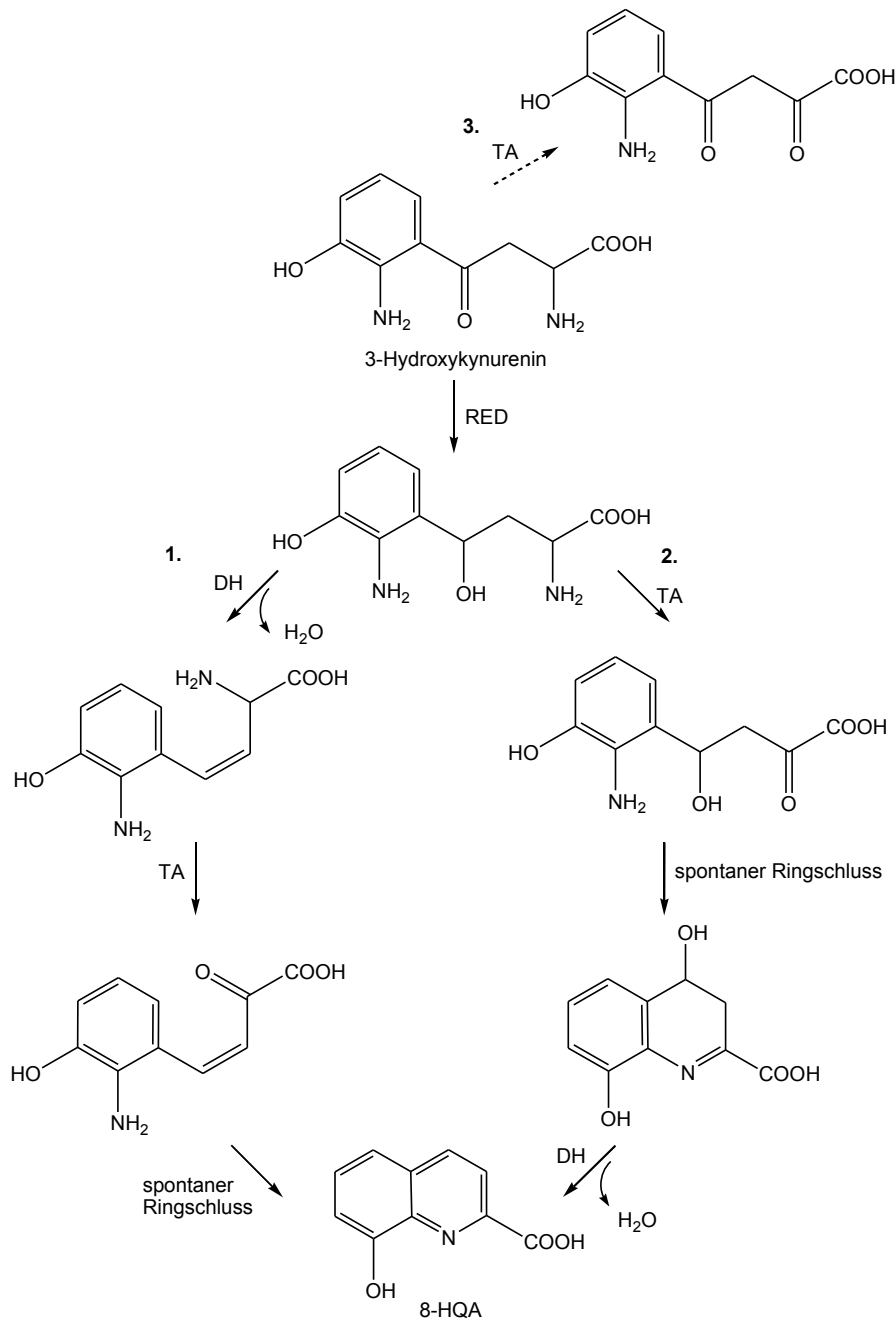


Abbildung 56. Letzte vermutete biosynthetische Schritte vom 3-Hydroxykynurenin zur 8-HQA.

RED = Reduktase, DH = Dehydratase, TA = Transaminase.

Verteilung und Synthesort von 8-HQA in der Larve

Nachdem die Hauptschritte der Biosynthese aufgeklärt werden konnten, sollte nun untersucht werden, wo in der Larve die 8-HQA-Bildung stattfindet. Dazu wurden zunächst

verschiedene Kompartimente (Darm, Fettkörper, Malpighische Gefäße, Hämolymphe) untersucht. 8-HQA konnte nur im Darm in sehr hohen Mengen detektiert werden; die Konzentration im Regurgitat lag bei 0,1-1 µg/µl (0,5-5 mM). In der Hämolymphe fanden sich relativ geringe Konzentrationen von 3-44 ng/µl (16-233 µM). Die Zwischenstufen Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin konnten in keinem Kompartiment detektiert werden. Wurden die verschiedenen Kompartimente oder auch Homogenisat von der kompletten Larve mit Trp-d5 inkubiert, konnte in keinem Fall eine Bildung von 8-HQA-d3 festgestellt werden. Auch die Inkubation von 3HK-d3 mit Darm führte nicht zu einer 8-HQA-d2 Bildung. Wurde Trp-d5 allerdings in die Hämolymphe injiziert, konnte nach 24 h 8-HQA-d3 im Regurgitat und Kot detektiert werden. Interessanterweise fanden sich bei der Injektion von 3HK-d3 keine 8-HQA-d2 im Regurgitat oder Kot. Aus den vorliegenden Ergebnissen können keine Rückschlüsse auf den Ort der 8-HQA-Synthese gezogen werden. Wahrscheinlich finden die Schritte in verschiedenen Kompartimenten statt.

8-HQA wird vorwiegend während der Larvenentwicklung produziert

Es konnte gezeigt werden, dass 8-HQA ein Abbauprodukt von Tryptophan ist und über Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin gebildet wird. In Insekten ist einer der Hauptwege des Tryptophanmetabolismus die Bildung von Ommochromen, den Augenpigmenten. Dieser Syntheseweg erfordert die Umwandlung von Tryptophan in 3-Hydroxykynurenin. Diese Komponente oxidiert allerdings leicht und kann ROS produzieren. Daher muss ihre Konzentration kontrolliert werden. Von *A. aegypti* ist bekannt, dass 3-Hydroxykynurenin während der Larvenentwicklung in die stabile Xanthurensäure überführt wird ⁷⁻⁹. Während des Puppenstadiums akkumuliert 3-Hydroxykynurenin, da in dieser Phase die Facettenaugen gebildet werden. 8-HQA und Xanthurensäure sind sich strukturell sehr ähnlich und könnten daher eine ähnliche Funktion besitzen. Um die Abhängigkeit vom Lebensstadium zu untersuchen, wurden 8-HQA und 3-Hydroxykynurenin in den verschiedenen Stadien von *S. littoralis* quantifiziert. Dazu wurden Larven verschiedenen Alters, Puppen und adulte Tiere in Methanol homogenisiert und die Menge der beiden Komponenten per LCMS quantifiziert. Abbildung 57 zeigt, dass 8-HQA vorwiegend während der Larvenentwicklung detektiert werden kann. In Puppen oder adulten Tieren können allenfalls Spuren gemessen werden. Das Gegenteil ist für 3-Hydroxykynurenin der Fall (Abbildung 58). Diese Substanz wird zum größten Teil in der Puppe gemessen. In Adulti und vor allem in der Larve detektiert man deutlich geringere Mengen.

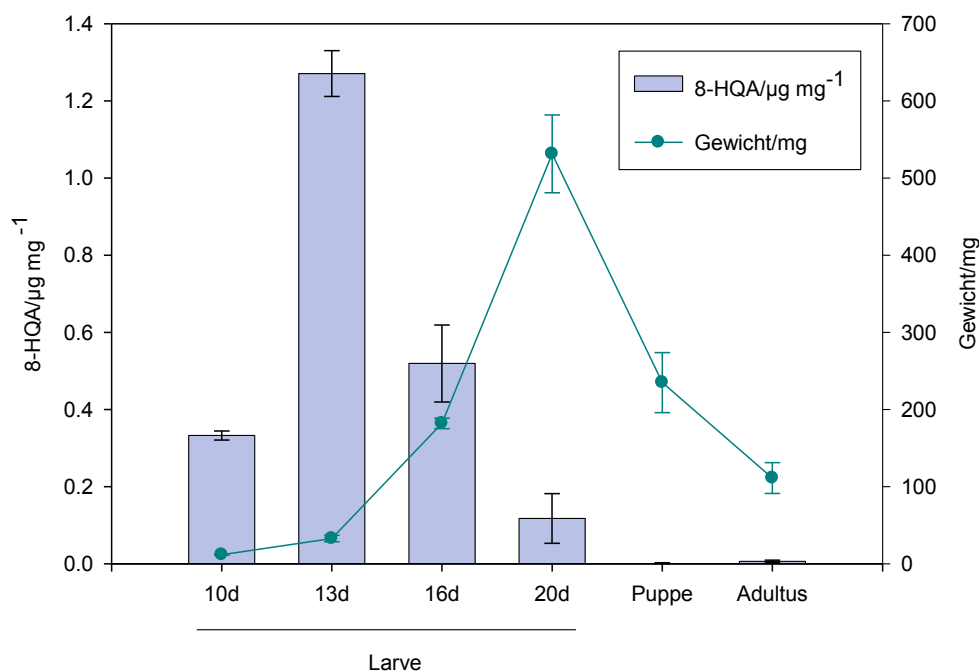


Abbildung 57. 8-HQA-Menge in verschiedenen Stadien von *S. littoralis*. Die Balken zeigen die 8-HQA-Menge an. Die Linie zeigt das Gewicht der Tiere. Es wurden Larven verschiedenen Alters, Puppen und Adulti verwendet. Die Tiere wurden jeweils in Methanol homogenisiert und der Überstand mittels LCMS analysiert. (n = 3)

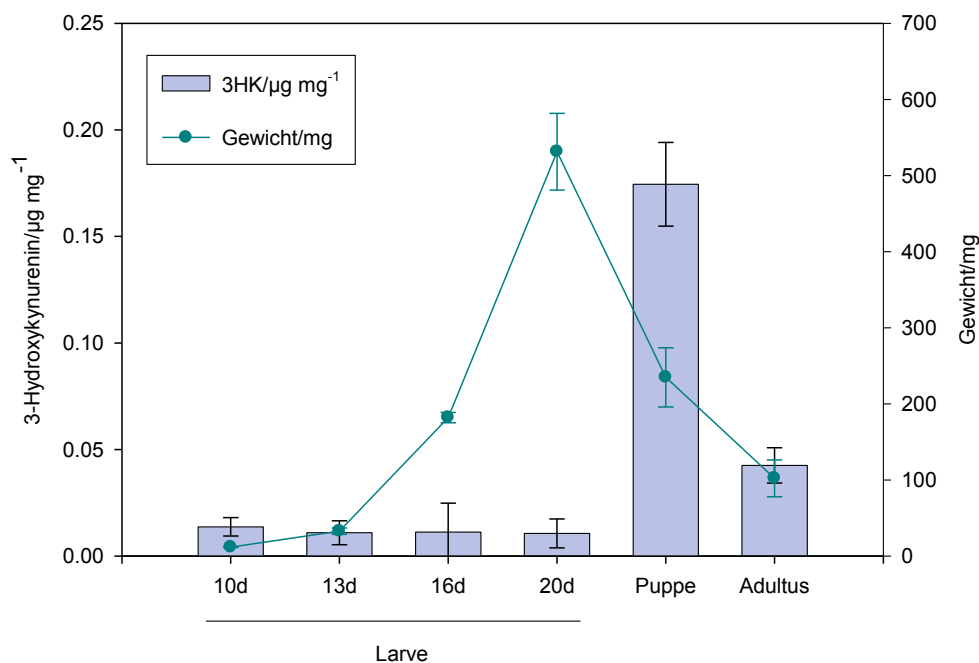


Abbildung 58. 3-Hydroxykynurenin-Menge in verschiedenen Stadien von *S. littoralis*. Die Balken zeigen die 3-Hydroxykynurenin-Menge an. Die Linie zeigt das Gewicht der Tiere. Es wurden Larven verschiedenen Alters, Puppen und Adulti verwendet. Die Tiere wurden jeweils in Methanol homogenisiert und der Überstand mittels LCMS analysiert. (n = 3)

Die Aufklärung des Biosyntheseweges und die Verteilung in den verschiedenen Lebensstadien zeigt für 8-HQA eine deutliche Ähnlichkeit zum Syntheseweg von Xanthurensäure in Taufliegen und Stechmücken. Beide werden aus 3-Hydroxykynurenin gebildet. Es wird angenommen, dass Xanthurensäure zur Entgiftung dieser potentiell toxischen Vorstufe gebildet wird. Xanthurensäure konnte nicht in *S. littoralis* detektiert werden. Möglicherweise hat die 8-HQA-Bildung die gleiche Funktion, nämlich die Entfernung des toxischen Tryptophanmetaboliten 3-Hydroxykynurenin.

Diskussion

Die Bildung von N-Acylaminosäuren durch bakterielle Enzyme

Um die richtigen Verteidigungsmechanismen einzusetzen, müssen Pflanzen erkennen, von wem sie angegriffen werden. Die Duftstoffsynthese in Mais-²⁵ oder Tabakpflanzen²⁶ wird durch N-Acylaminosäure-Konjugate aus dem Speichel von Lepidoptera-Larven induziert. Diese Konjugate können nicht nur von den Larven selbst^{42, 43} sondern auch von ihren Darmbakterien hergestellt werden^{1, 44, 45}. Aus einem Darmbakterienstamm, *M. arborescens*, war zuvor ein Konjugationsenzym (AAH) gereinigt worden, das Homologie zu DPS-Proteinen zeigt². In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass es zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen aus dem Insektendarm Unterschiede gibt, wie hoch die Aktivität ist und zu welchem Zeitpunkt des Wachstums sie vorhanden ist. Die Unterschiede und Gemeinsamkeiten stehen in keinem Zusammenhang mit verwandtschaftlichen Beziehungen. Dies deutet darauf hin, dass die Konjugationsaktivität durch unterschiedliche Enzyme ermöglicht wird. Tatsächlich kommt das bereits bekannte Enzym AAH in anderen konjugationsaktiven Stämmen nicht vor. Damit war es interessant zu erfahren, welche Enzyme andere Bakterien für diese Aktivität nutzen. In aktiven *R. erythropolis*-Proteinfractionen kann schließlich eine Glutamatdehydrogenase identifiziert werden. Für *A. nicotianae* Se 35 gelang zwar keine saubere Reinigung, das wahrscheinlichste Konjugationsenzym ist jedoch eine Putrescinoxidase, da diese in allen aktiven Fraktionen als Hauptprotein vorkommt. In früheren Arbeiten mit *L. komagatae* wurden aktive Proteinfractionen gefunden, welche keine Gemeinsamkeiten zu den bereits genannten haben. Dabei gab es unter anderem Hinweise auf eine aktive Superoxiddismutase (Rita Büchler, persönliche Mitteilung). Es ergeben sich somit keine Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen konjugationsaktiven Proteinen von Darmbakterien. Wahrscheinlich können ganz unterschiedliche Enzyme die Konjugation zwischen einer Fettsäure und einer Aminosäure katalysieren. Dies wird unterstützt von Berichten über heterologe Expression von Proteinen nicht kultivierbarer Mikroorganismen aus Umwelt-DNA¹²³⁻¹²⁵. Bei diesen Versuchen wurden zahlreiche Proteine identifiziert, die alle N-Acylaminosäuren synthetisieren können. Diese sind jedoch unterschiedlich und gehören keiner homogenen Gruppe an. Berichte über Konjugatbildung finden sich auch von kultivierbaren Bakterien wie *Streptomyces mobaraensis*¹²⁶ und *Bacillus pumilus*¹²⁷. Manche Bakterien besitzen wohl auch mehrere konjugationsaktive Enzyme. *M. arborescens* beispielsweise zeigt auch in frühen Wachstumsphasen Aktivität, wenn AAH noch nicht exprimiert wird. Auch wird AAH nicht bei pH 6 und pH 10 exprimiert, eine *M. arborescens*-Kultur zeigte allerdings bei pH 6-10 keine Aktivitätsunterschiede. Da die gereinigten Darmbakterien-Enzyme jeweils Homologien

zu Proteinen anderer Funktion haben (DPS-Protein, Glutamatdehydrogenase), ist die Konjugationsaktivität wahrscheinlich eine Nebenaktivität des jeweiligen Proteins. Es ist bislang in keinem Fall gelungen, ein funktionelles Konjugationsenzym heterolog zu exprimieren. Es kann viele Gründe für erfolglose heterologe Expressionen geben. Möglicherweise wird die Nebenaktivität über eine Modifikation des Enzyms erreicht, die bei einer heterologen Expression nicht berücksichtigt wird. In früheren Arbeiten wurde bereits entdeckt, dass heterolog exprimierte AAH einen Massenunterschied zur nativen AAH hat, welcher der einer Acetylgruppe entspricht ¹⁰⁸. Doch leider war die gemeinsame Expression einer Acetyltransferase mit AAH nicht erfolgreich. Da für GDH und PUOX jeweils nur verwandte Arten für die heterologe Expression verwendet wurden, wäre es natürlich möglich, dass hier schlicht die „falschen“ Proteine untersucht wurden. Die Expression der GDH aus *R. erythropolis* wäre sicherlich sinnvoll. Kürzlich wurde dieser Organismus sequenziert und die GDH-Sequenz ist verfügbar (RER_38460). Nicht auszuschließen ist auch, dass bei der Reinigung aktiver Proteinfractionen das „richtige“ Konjugationsenzym nicht auf den 2D-PA-Gelen erscheint. Gründe könnten seine geringe Konzentration oder eine Proteineigenschaft sein, welche es verhindert in das 2D-PA-Gel zu gelangen.

Die Bildung von *N*-Acylaminosäure-Konjugaten ist in jedem Fall ein weitverbreitetes Phänomen, dessen Rolle für Mikroorganismen noch nicht aufgeklärt ist. Verschiedene Konjugate wie *N*-Acyl-L-tyrosin, -tryptophan und -arginin zeigen antibiotische Wirkung ¹²³⁻¹²⁵. Außerdem wurde nachgewiesen, dass *N*-Linolenoyl-L-glutamin Quorum-Sensing (bakterielle Kommunikation) in dem Reporterorganismus *E. coli* RV308pSB40 inhibiert ¹²⁸. Dies wäre natürlich eine mögliche Funktion dieser Substanzen. Andererseits liegt das enzymatische Gleichgewicht von AAH auf der Seite der Hydrolyse-Reaktion ². Auch eine Carboxypeptidase aus *Pseudomonas* sp. ¹²⁹ und eine Acylase aus *S. mobaraensis* ¹²⁶ zeigen Konjugat-Hydrolyse. Interessanterweise wurde gezeigt, dass auch diese Hydrolyse eine Störung der bakteriellen Kommunikation über Homoserinlactone bewirken könnte ¹²⁸. Diese Signalmoleküle gramnegativer Bakterien würden unter den alkalischen Bedingungen des Darms zunächst einer Ringöffnung unterworfen. AAH (und möglicherweise andere Konjugationsenzyme) wären anschließend in der Lage, diese *N*-Acylhomoserine zu hydrolysieren. Eine einfachere Erklärung für die bakterielle Hydrolyse von *N*-Acylaminosäuren wäre hingegen deren Nutzung als Nahrungsquelle. *N*-Acylaminosäuren werden auch von Lepidoptera-Larven selbst hergestellt ^{42, 43}. Schon in den 1970er Jahren wurde vermutet, dass sie verschiedenen Invertebraten als Nahrungsemulgatoren dienen ³⁹. Doch sie könnten auch in der direkten Fraßfeind-Abwehr ⁴¹ oder dem Stickstoff-metabolismus ²⁹ eine Rolle spielen. Es ist also noch nicht geklärt, warum *N*-Acylaminosäuren in Lepidoptera-Larven vorkommen und welche ökologische Relevanz die Konjugationsaktivität ihrer Darmbakterien hat. Es konnte bislang auch nicht gezeigt werden,

welchen Anteil an der Produktion der Konjugate die Larve bzw. die Bakterien haben. Erste Experimente mit sterilen *S. exigua*-Larven ergaben tendenziell eine leichte Reduktion der Konjugate, aber das Ergebnis ist nicht als eindeutig anzusehen⁴⁵. Möglicherweise synthetisieren sowohl Bakterien als auch das Insekt einen Teil der Konjugate im Darm. Die bislang untersuchten konjugationsaktiven Bakterienstämme scheinen keinen großen Anteil an der üblichen Darmmikrobiota von *Spodoptera*-Larven zu haben. Zumindest konnten diese Arten in aktuellen 16S rDNA-basierten Studien nicht im Darm nachgewiesen werden (Xiaoshu Tang und Liyan Ping, persönliche Mitteilung). Dies bedeutet, dass zumindest deren Konjugationsenzyme wahrscheinlich keine Rolle an der Produktion der *N*-Acylaminosäuren im *Spodoptera*-Darm spielen. Zudem ist nicht bekannt, ob Konjugationsenzyme wie AAH überhaupt unter Darmbedingungen exprimiert würden. Der *in vivo* Beweis steht somit noch aus.

Die Regulation von AAH, einem konjugationsaktiven DPS-Protein

Das konjugationsaktive AAH aus *M. arborescens* zeigt Homologien zu DPS-Proteinen. Proteinsequenzvergleiche ergaben 60% bzw. 57% Identität mit DPS-Proteinen aus *Leifsonia xyli* oder *Clavibacter michiganensis*. Die Suche nach konservierten Domänen ergab ein putatives Ferroxidase-Zentrum und eine Ionenpore, die wahrscheinlich als Eingangstunnel für Eisenionen dient. DPS-Proteine reduzieren H_2O_2 zu Wasser und bieten somit Schutz vor oxidativem Stress. Gleichzeitig wird Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert und das Eisen im Protein gebunden. AAH ist ein ungewöhnliches DPS-Protein, da es in der Lage ist, *N*-Acylaminosäuren herzustellen. Daher sollte seine Regulation untersucht werden, um mehr über die Hauptaufgabe dieses Proteins zu erfahren. Die Regulation von DPS-Proteinen ist sehr unterschiedlich. Viele werden über verschiedene Stressbedingungen oder über die Eisenkonzentration reguliert. Diese Arbeit zeigt, dass AAH ähnlich wie einige andere DPS-Proteine³⁻⁶ in der stationären Wachstumsphase induziert wird. In dieser Phase sind Bakterienzellen verstärkt oxidativem Stress und Nährstoffmangel ausgesetzt. AAH-Expression wurde jedoch nicht durch die Zugabe von H_2O_2 beeinflusst. Es scheinen andere Faktoren bei der Induktion in der stationären Phase eine Rolle zu spielen. Diese könnten eine gewisse Zelldichte, bestimmte Mangelercheinungen oder toxische Stoffwechselprodukte sein. Schließlich wurde gezeigt, dass AAH auch über Eisen reguliert wird. Durch die Zugabe eines Ferrioxamin-Siderophors aus *Streptomyces* sp. wird AAH schon in der exponentiellen Wachstumsphase induziert und dann konstitutiv exprimiert. Die Zugabe von FeSO_4 führt hingegen nur zu einer kurzfristigen AAH-Induktion. Die Zugabe von FeCl_3 hat keinen Effekt auf die AAH-Expression. Diese Ergebnisse zeigen, dass AAH durch

Fe^{2+} reguliert wird. Unter normalen Bedingungen befindet sich wahrscheinlich überwiegend Fe^{3+} im Wachstumsmedium. Werden Siderophore zugesetzt, binden sie dieses und transportieren es in die Bakterienzelle, wo es zu Fe^{2+} reduziert wird. Fe^{2+} verursacht die gefährliche Fenton-Reaktion, welche DPS-Proteine verhindern können. Da Siderophore rezykliert werden, hält dieser Effekt über mehrere Stunden an. Zusätzliches FeSO_4 hingegen ist nach kurzer Zeit vollständig oxidiert und verursacht daher nur eine kurzfristige AAH-Induktion in der exponentiellen Wachstumsphase. In Anwesenheit eines Chelators wird kein AAH exprimiert, da kein freies Eisen vorhanden ist. Die Induktion durch Fe^{2+} verdeutlicht, dass AAH ein Schutzprotein ist, welches die Fenton-Reaktion und somit die Bildung gefährlicher ROS verhindert. In Anwesenheit von AAH wird reaktives Fe^{2+} oxidiert und im Protein gebunden. Erstaunlicherweise konnte durch H_2O_2 keine Induktion festgestellt werden. *M. arborescens* nutzt wahrscheinlich andere Enzyme (z. B. Katalasen) für dessen Entgiftung. Interessanterweise werden die meisten DPS-Proteine durch Eisenmangel induziert^{5, 6, 57}. Dies wird damit begründet, dass unter Eisenmangel der Kofaktor Fe^{2+} im DPS-Protein fehlt, um H_2O_2 zu reduzieren⁵⁷. Dies führt zu erhöhtem oxidativen Stress und somit zu vermehrter DPS-Expression. Dass AAH im Gegensatz dazu durch Eisenüberschuss induziert wird, könnte bedeuten, dass es nicht nur als Entgiftungsenzym, sondern auch als Eisenspeicher arbeitet, was sonst eher für Ferritine gilt. Deren Expression wird ebenfalls durch Eisen induziert¹³⁰. Die Regulation von DPS-Proteinen ist somit sehr variabel und sie scheinen in unterschiedlichen Organismen unterschiedliche Aufgaben übernehmen zu können. Welche Rolle die Konjugationsaktivität von AAH für *M. arborescens* spielt, ist allerdings noch fraglich. Die bisherigen Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass es sich bei dieser Eigenschaft um eine Nebenaktivität verschiedener Enzyme handelt. Es konnte bislang nicht beantwortet werden, ob die Konjugate z. B. als Antibiotika oder als Mittel zur Unterdrückung bakterieller Kommunikation dienen könnten. Die Hauptaufgabe von AAH ist wahrscheinlich die Entgiftung und Speicherung von Eisen.

8-HQA, ein Eisenchelator aus dem Darm von Lepidoptera-Larven

8-HQA kommt im Darm von *Spodoptera*-Larven in hohen Konzentrationen vor. Chinolinderivate sind in der Natur recht häufig, 8-HQA wurde allerdings bislang in keinem anderen Organismus identifiziert. Da ähnliche Strukturen sowohl von Bakterien als auch von Insekten bekannt sind, war zunächst fraglich, ob die 8-HQA von der Larve selbst oder von ihren Darmbakterien synthetisiert wird. In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass diese Substanz von der Larve stammt. Bei einem Vergleich verschiedener Arten wurde 8-HQA nur in Noctuidae-Arten detektiert. Die fünf anderen untersuchten Arten aus fünf

verschiedenen Familien bilden keine 8-HQA. Dieses Auftreten in verwandten Arten spricht dafür, dass die 8-HQA von den Larven selbst gebildet wird, da diese wahrscheinlich keine spezifische Darmmikrobiota besitzen. Weitere Versuche konnten dann auch zeigen, dass Darmbakterien nicht für die 8-HQA-Synthese verantwortlich sind. Werden *S. littoralis*-Larven mit einem antibiotikahaltigem Futter gefüttert, sinkt die Bakterienzahl im Regurgitat beträchtlich. Die Menge neugebildeter 8-HQA wird dabei aber nicht beeinflusst. Zudem synthetisieren weder isolierte Darmbakterienstämme in Kultur noch die komplette Darmmikrobiota 8-HQA. *Spodoptera*-Larven bilden diese Substanz also selbst. Die Funktion der 8-HQA ergibt sich möglicherweise aus ihrer Fähigkeit Komplexe mit Eisen zu bilden. Diese Eigenschaft konnte auch für strukturell ähnliche Substanzen wie Quinolobactin aus *P. fluorescens* gezeigt werden^{81, 131}. Quinolobactin ist ein Siderophor, das heißt, es bindet schlecht verfügbares Eisen und transportiert es in die Bakterienzelle. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass dies auch für 8-HQA gilt, da es bislang keine Beispiele für Insekten-Siderophore gibt. Zudem wird 8-HQA nicht über die Eisenkonzentration im Futter reguliert, was für ein Siderophor unbedingt notwendig wäre. Eine wahrscheinlichere Funktion ist daher die antibakterielle Wirkung aufgrund der Eisenbindekapazität. Es konnte gezeigt werden, dass 8-HQA oder Regurgitat das Wachstum verschiedener Bakterienstämme inhibiert. Diese Inhibition geschieht aufgrund der Komplexierung von Eisen. Kultiviert man *E. coli* in Anwesenheit von 8-HQA und Eisen, wird der Hemmeffekt aufgehoben und es zeigt sich kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Auch auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass 8-HQA wie ein Eisenchelator wirkt, da die Expression bzw. Aktivität einiger eisenhaltiger Enzyme inhibiert wird. Interessanterweise wirkt 8-HQA nicht gegen alle getesteten Mikroorganismen. *E. mundtii* und *S. entomophila* sind nicht beeinflusst durch die Substanz. *E. mundtii* macht einen sehr großen Anteil an der normalen Darmmikrobiota von *Spodoptera*-Larven aus (Xiaoshu Tang und Liyan Ping, persönliche Mitteilung). Anscheinend ist diese Art besonders gut an die Darmbedingungen und hohe 8-HQA-Konzentrationen angepasst. *S. entomophila* ist ebenfalls ein Organismus, welcher gut mit den Eigenschaften des Insektendarms zurecht kommt. Er befällt den Darm des Engerlings *C. zealandica*, um nach einiger Zeit eine Infektion zu verursachen^{118, 132}. Ob *C. zealandica* allerdings 8-HQA oder eine ähnliche Komponente in seinem Darm hat, ist nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung für die 8-HQA-Resistenz einiger Bakterienarten könnte das Vorhandensein „stärkerer“ Eisenaufnahmemechanismen sein. Dies könnte ebenso für Pilze gelten, die ebenfalls nicht inhibiert waren. Ob die Wachstumshemmung von 8-HQA auf die pathogenen Bakterien in der Natur eine Rolle spielt, ist schwer abzuschätzen. Das Pathogen *X. nematophila* beginnt schon in der Hämolymphe seine Infektion. Die dort vorliegende 8-HQA-Konzentration ist allerdings zu gering, um dessen Wachstum zu inhibieren. *B. thuringiensis* und *L. sphaericus* bilden erst im Sporenstadium ihre kristallinen Toxine. Möglicherweise

kann 8-HQA aber schon durch die Hemmung des vegetativen Wachstums verhindern, dass sich später toxische Sporen ausbilden. Es wäre interessant zu untersuchen, ob andere relevante infektiösausschüttende Bakterien ebenfalls durch 8-HQA gehemmt werden. Hemmung des bakteriellen Wachstums über Eisenkomplexierung ist in Wirbeltieren auch als Eisenrückhaltestrategie bekannt¹³³⁻¹³⁵. Dort werden verschiedene Proteine eingesetzt, die den Bakterien die Eisenaufnahme erschweren. Lactoferrin beispielsweise komplexiert Fe^{3+} während Siderocalin Catechol-Siderophore bindet. Es gibt Hinweise, dass Insekten ähnliche Strategien verfolgen. Möglicherweise wirkt 8-HQA in *Spodoptera*-Larven als zusätzliche antimikrobielle Komponente. Antibiotische Wirkung konnte schon für verschiedene 8-Hydroxychinolinderivate gezeigt werden^{87, 88}. Auch Chinolinsäurederivate unterschiedlichster Herkunft zeigen antibiotische Wirkung. Beispiele sind die Chinaldinsäure aus dem Meerträubel *Ephedra pachyclada*¹³⁶, die 4,5,8-Trihydroxychinolin-2-carbonsäure aus dem Schwamm *D. membranosa*⁸⁶ oder Perspicamid A und B aus der Seescheide *Botrylloides perspicuum*¹³⁷. Es ist nicht bekannt, welche Aufgaben die verschiedenen antimikrobiellen Chinolinderivate haben. In *Spodoptera*-Larven trägt 8-HQA möglicherweise dazu bei, dass sich nur bestimmte Mikroorganismen ansiedeln können bzw. andere nur geringfügiges Wachstum zeigen. Untersuchungen über die Zusammensetzung der Darmmikrobiota könnten dabei aufschlussreich sein. Besonders interessant wäre der Vergleich mit Larven, bei denen die Fähigkeit 8-HQA zu bilden, ausgeschaltet wäre. Doch möglicherweise hat auch schon die Eisenkonzentration im Futter einen Einfluss auf Mikroorganismenzusammensetzung. Die tatsächliche Konzentration von Eisen im Darm, welches nicht in Proteinen gebunden ist, ist ca. 1.000-fach niedriger als die dort gemessene 8-HQA-Konzentration. Dies kann jedoch damit erklärt werden, dass diese Substanz wahrscheinlich eine deutlich niedrigere Komplexbildungskonstante besitzt als andere bakterielle Siderophore bzw. Eisenbindepoteine, wie Transferrin. Für Komplexe von 8-HQA mit anderen Metallen, wie z. B. Zn, Ni oder Cu wurden relativ niedrige Werte ($\log K_1 = 9-13$) bestimmt⁹⁶. Auch das strukturell ähnliche Quinolobactin wurde als vergleichsweise schwaches Siderophor eingestuft¹³¹. Die hohe Konzentration von 8-HQA könnte somit möglicherweise ihre schwache Komplexstärke ausgleichen. Um dies näher zu untersuchen, wäre es sinnvoll, die genaue Komplexbildungskonstante unter Darmbedingungen zu bestimmen.

Neben der antibiotischen Wirkung könnte 8-HQA aber auch noch eine weitere Funktion für die Larve besitzen. 8-HQA stammt aus dem Tryptophanmetabolismus⁹⁷. Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, welche einen relativ geringen Anteil in Proteinen hat⁹⁸. Die Zahl der biologisch aktiven Komponenten, welche aus Tryptophan gebildet werden, ist jedoch groß. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ca. 10% des aufgenommenen Tryptophan kontinuierlich in

8-HQA umgewandelt und ausgeschieden werden. 8-HQA wird demnach nicht in der Larve rezykliert. Seine Aufgabe könnte somit die Entfernung überschüssigen Tryptophans bzw. eines seiner Abbauprodukte zu sein. Genauere Hinweise ergeben sich aus der Aufklärung des Biosynthesewegs. 8-HQA wird ähnlich wie die strukturell verwandte Xanthurensäure⁷⁻⁹ über Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin gebildet. Die Bildung von 3-Hydroxykynurenin ist einer der Hauptwege des Tryptophanmetabolismus in Insekten, da sie die Vorstufe von Ommochromen, den Augenpigmenten ist⁹⁸. Es ist aber auch eine sehr reaktive Substanz, die leicht oxidiert und zur Bildung von ROS beitragen kann. Daher muss seine Konzentration streng reguliert werden. In *A. aegypti* konnte gezeigt werden, dass 3-Hydroxykynurenin während des Larvenstadiums in die stabile Xanthurensäure umgewandelt wird⁷⁻⁹. In der Puppe wird diese Reaktion herunter reguliert und 3-Hydroxykynurenin akkumuliert, da es in diesem Stadium für die Entwicklung der Facettenaugen benötigt wird. Xanthurensäure konnte nicht in *Spodoptera*-Larven nachgewiesen werden. 8-HQA könnte demnach deren Aufgabe übernehmen: die Eliminierung der toxischen Vorstufe 3-Hydroxykynurenin. Tatsächlich wird 8-HQA nur in der Larve detektiert. In der Puppe und in Adulti finden sich allenfalls Spuren dieser Substanz. 3-Hydroxykynurenin hingegen liegt in der Larve nicht oder nur in geringen Mengen vor, hingegen sind in der Puppe große Mengen vorhanden. Es wäre interessant zu prüfen, in welche Substanzen andere Arten 3-Hydroxykynurenin überführen. Nachdem die wichtigsten Schritte der 8-HQA-Synthese aufgeklärt werden konnten, besteht noch die Frage, wo diese stattfinden. Es ist bislang nicht gelungen, *in vitro* die Bildung von 8-HQA zu verfolgen. Es scheint, dass die Syntheseschritte in verschiedenen Kompartimenten stattfinden. Hier wären weitere Untersuchungen von Interesse.

Ob 8-HQA auch eine Rolle in der direkten Verteidigung von *Spodoptera*-Larven spielen könnte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es gibt verschiedene Beispiele für ähnliche Strukturen aus Insekten, welche abschreckende Wirkung auf Fraßfeinde haben. Diese Wirkung konnte für Chinolin aus dem Wehrsekret der Gespenstschrecke *O. peruana* auf Ameisen, Spinnen, Schaben und Frösche gezeigt werden⁸⁰. Auch für das Chinaldinsäurederivat N α -quinaldyl-L-arginin-HCl aus der Hämolymphe des Marienkäfers *Subcoccinella 24-punctata* konnte abschreckende Wirkung auf Ameisen gezeigt werden¹⁰⁷. Andere mögliche abstoßende Substanzen sind der Bitterstoff 1-Methyl-2-chinolon aus dem Rotdeckenkäfer *Metriorrhynchus rhipidius*¹⁰⁶ oder der bereits erwähnte 8-HQA-methylester aus dem Wehrsekret des Schwimmkäfers *I. fenestratus*⁷⁶. *Spodoptera*-Larven nutzen das Hervorwürgen des Vorderdarminhaltes als direkten Verteidigungsmechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass das Regurgitat von *S. exigua* aufgrund seiner Tensid-Eigenschaft abschreckende Wirkung auf Ameisen hat, da es ihre Fühler verklebt⁴¹. Ob Regurgitat auch aufgrund von Sekundärmetaboliten abstoßende Wirkung hat, konnte dort nicht eindeutig

geklärt werden. *Myrmica rubra*-Ameisen unterschieden in Futtertests nicht zwischen einer Regurgitat-kontaminierten Zuckerlösung und der Kontrolle. Von *Solenopsis invicta*-Ameisen hingegen fraßen signifikant weniger Individuen von der Regurgitat-Zuckerlösung. Es wäre interessant zu testen, ob 8-HQA auch einen Einfluss auf das Fraßverhalten von Feinden hat.

Zusammengefasst kann man feststellen, dass die Eigenschaften von 8-HQA für *S. littoralis* vielfältig zu sein scheinen. In dieser Arbeit konnte der Einfluss der Eisen-komplexierenden Wirkung der 8-HQA auf Bakterien nachgewiesen werden. Zudem gibt es Hinweise, welche darauf hindeuten, dass 8-HQA das Abbauprodukt einer toxischen Vorstufe des Tryptophanmetabolismus ist. Ob 8-HQA auch ein Schreckstoff gegen Fraßfeinde ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, wäre aber eine interessante Fragestellung für die Zukunft.

Referenzen

1. **Spiteller, D., Dettner, K. & Boland, W.** Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: Microbial biosynthesis of *N*-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *Biological Chemistry* 381, 755-762 (2000).
2. **Ping, L.Y., Büchler, R., Mithöfer, A., Svatos, A., Spiteller, D., Dettner, K., Gmeiner, S., Piel, J., Schlott, B. & Boland, W.** A novel Dps-type protein from insect gut bacteria catalyses hydrolysis and synthesis of *N*-acyl amino acids. *Environmental Microbiology* 9, 1572-1583 (2007).
3. **Almiron, M., Link, A.J., Furlong, D. & Kolter, R.** A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes & Development* 6, 2646-2654 (1992).
4. **Nicodeme, M., Perrin, C., Hols, P., Bracquart, P. & Gaillard, J.L.** Identification of an iron-binding protein of the Dps family expressed by *Streptococcus thermophilus*. *Current Microbiology* 48, 51-56 (2004).
5. **Polidoro, M., De Biase, D., Montagnini, B., Guarrera, L., Cavallo, S., Valenti, P., Stefanini, S. & Chiancone, E.** The expression of the dodecameric ferritin in *Listeria* spp. is induced by iron limitation and stationary growth phase. *Gene* 296, 121-128 (2002).
6. **Sen, A., Dwivedi, K., Rice, K.A. & Bullerjahn, G.S.** Growth phase and metal-dependent regulation of the *dpsA* gene in *Synechococcus* sp strain PCC 7942. *Archives of Microbiology* 173, 352-357 (2000).
7. **Li, J.Y. & Li, G.Y.** Transamination of 3-hydroxykynurenine to produce xanthurenic acid: A major branch pathway of tryptophan metabolism in the mosquito, *Aedes aegypti*, during larval development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 859-867 (1997).
8. **Li, J.Y., Beerntsen, B.T. & James, A.A.** Oxidation of 3-hydroxykynurenine to produce xanthommatin for eye pigmentation: a major branch pathway of tryptophan catabolism during pupal development in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 329-338 (1999).
9. **Han, Q., Beerntsen, B.T. & Li, J.Y.** The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. *Journal of Insect Physiology* 53, 254-263 (2007).
10. **Sitte, P., Weiler, E.W., Kadereit, J.W., Bresinsky, A. & Körner, C.** Strasburger Lehrbuch der Botanik (2002).
11. **Nultsch, W.** Allgemeine Botanik (1996).
12. **Marner, F.-J.** Chemische Kriegslisten zur Abwehr von Schadinsekten. *Chemie in unserer Zeit* 27, 88-95 (1993).
13. **Baldwin, I.T., Schmelz, E.A. & Ohnmeiss, T.E.** Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* Spengazzini and Comes *Journal of Chemical Ecology* 20, 2139-2157 (1994).

14. **Heil, M.** Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178, 41-61 (2008).
15. **Heil, M., Greiner, S., Meimberg, H., Krüger, R., Noyer, J.L., Heubl, G., Linsenmair, K.E. & Boland, W.** Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature* 430, 205-208 (2004).
16. **Heil, M., Koch, T., Hilpert, A., Fiala, B., Boland, W. & Linsenmair, K.E.** Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1083-1088 (2001).
17. **Heil, M.** Induction of two indirect defences benefits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology* 92, 527-536 (2004).
18. **Wäckers, F.L., Zuber, D., Wunderlin, R. & Keller, F.** The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. *Annals of Botany* 87, 365-370 (2001).
19. **Arimura, G., Kost, C. & Boland, W.** Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1734, 91-111 (2005).
20. **Leitner, M., Boland, W. & Mithöfer, A.** Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 167, 597-606 (2005).
21. **Schulze, B., Kost, C., Arimura, G.-I. & Boland, W.** Duftstoffe: Die Sprache der Pflanzen. Signalrezeption, Biosynthese und Ökologie. *Chemie in unserer Zeit* 40, 366-377 (2006).
22. **Dicke, M., Sabelis, M.W. & Vandenbergh, H.** Does prey preference change as a result of prey species being presented together - Analysis of prey selection by the predatory mite *Typhlodromus pyri* (Acarina, Phytoseiidae). *Oecologia* 81, 302-309 (1989).
23. **Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H. & Lewis, W.J.** Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250, 1251-1253 (1990).
24. **Mattiacci, L., Dicke, M. & Posthumus, M.A.** b-Glucosidase, an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2036-2040 (1995).
25. **Alborn, T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H. & Tumlinson, J.H.** An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276, 945-949 (1997).
26. **Halitschke, R., Schittko, U., Pohnert, G., Boland, W. & Baldwin, I.T.** Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiology* 125, 711-717 (2001).

27. **Pohnert, G., Jung, V., Haukioja, E., Lempa, K. & Boland, W.** New fatty acid amides from regurgitant of lepidopteran (Noctuidae, Geometridae) caterpillars. *Tetrahedron* 55, 11275-11280 (1999).
28. **Pare, P.W., Alborn, H.T. & Tumlinson, J.H.** Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13971-13975 (1998).
29. **Yoshinaga, N., Aboshi, T., Abe, H., Nishida, R., Alborn, H.T., Tumlinson, J.H. & Mori, N.** Active role of fatty acid amino acid conjugates in nitrogen metabolism in *Spodoptera litura* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18058-18063 (2008).
30. **Truitt, C.L., Wei, H.X. & Pare, P.W.** A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell* 16, 523-532 (2004).
31. **Maffei, M., Bossi, S., Spiteller, D., Mithöfer, A. & Boland, W.** Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiology* 134, 1752-1762 (2004).
32. **Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Plesch, G. & Muller-Rober, B.** Ion channels in plant signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 183-203 (1999).
33. **Kodama, H., Nishiuchi, T., Seo, S., Ohashi, Y. & Iba, K.** Possible involvement of protein phosphorylation in the wound-responsive expression of Arabidopsis plastid omega-3 fatty acid desaturase gene. *Plant Science* 155, 153-160 (2000).
34. **Seo, S., Okamoto, N., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H. & Ohashi, Y.** Tobacco MAP kinase - a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* 270, 1988-1992 (1995).
35. **Hamberg, M. & Gardner, H.W.** Oxylipin pathway to jasmonates - biochemistry and biological significance. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1165, 1-18 (1992).
36. **Vick, B.A. & Zimmerman, D.C.** Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* 75, 458-461 (1984).
37. **Wasternack, C.** Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100, 681-697 (2007).
38. **Staswick, P.E. & Tiryaki, I.** The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2117-2127 (2004).
39. **Collatz, K.G. & Mommsen, T.** Die Struktur der emulgierenden Substanzen verschiedener Invertebraten. *Journal of Comparative Physiology* 94, 339-352 (1974).
40. **Yoshinaga, N., Aboshi, T., Ishikawa, C., Fukui, M., Shimoda, M., Nishida, R., Lait, C.G., Tumlinson, J.H. & Mori, N.** Fatty acid amides, previously identified in caterpillars, found in the cricket *Teleogryllus taiwanemma* and fruit fly *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Chemical Ecology* 33, 1376-1381 (2007).

41. **Rostas, M. & Blassmann, K.** Insects had it first: surfactants as a defence against predators. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 276, 633-638 (2009).
42. **Lait, C.G., Alborn, H.T., Teal, P.E.A. & Tumlinson, J.H.** Rapid biosynthesis of *N*-linolenoyl-L-glutamine, an elicitor of plant volatiles, by membrane-associated enzyme(s) in *Manduca sexta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7027-7032 (2003).
43. **Yoshinaga, N., Morigaki, N., Matsuda, F., Nishida, R. & Mori, N.** *In vitro* biosynthesis of volicitin in *Spodoptera litura*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 175-184 (2005).
44. **Boland, W. & Spiteller, D.** Mikrobielle Symbionten von Insekten und ihre Bedeutung für die Pflanzen. *Rundgespräche der Kommission für Ökologie* 23, 111-122 (2002).
45. **Spiteller, D.** Charakterisierung von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten aus dem Regurgitat von Lepidoptera Larven. *Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität, Jena* (2002).
46. **Chiancone, E.** Dps Proteins, an Efficient Detoxification and DNA Protection Machinery in the Bacterial Response to Oxidative Stress. *Rendiconti Lincei-Scienze Fisiche E Naturali* 19, 261-270 (2008).
47. **Chiancone, E., Ceci, P., Ilari, A., Ribacchi, F. & Stefanini, S.** 197-202 (Kluwer Academic Publ, Capri, ITALY, 2003).
48. **Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodriguez-Quinones, F.** Bacterial iron homeostasis. *Fems Microbiology Reviews* 27, 215-237 (2003).
49. **Wang, S.W., Chen, C.Y., Tseng, J.T., Liang, S.H., Chen, S.C., Hsieh, C., Chen, Y.H. & Chen, C.C.** orf4 of the *Bacillus cereus* sigB Gene Cluster Encodes a General Stress-Inducible Dps-Like Bacterioferritin. *Journal of Bacteriology* 191, 4522-4533 (2009).
50. **Castruita, M., Saito, M., Schottel, P.C., Elmegreen, L.A., Myneni, S., Stiefel, E.I. & Morel, F.M.M.** Overexpression and characterization of an iron storage and DNA-binding Dps protein from *Trichodesmium erythraeum*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2918-2924 (2006).
51. **Facey, P.D., Hitchings, M.D., Saavedra-Garcia, P., Fernandez-Martinez, L., Dyson, P.J. & Del Sol, R.** *Streptomyces coelicolor* Dps-like proteins: differential dual roles in response to stress during vegetative growth and in nucleoid condensation during reproductive cell division. *Molecular Microbiology* 73, 1186-1202 (2009).
52. **Weber, A., Kogl, S.A. & Jung, K.** Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 188, 7165-7175 (2006).
53. **Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Sorokin, A., Lapidus, A. & Hecker, M.** Expression of a stress- and starvation-induced dps/pexB-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor sigma(B) in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 179, 7251-7256 (1997).

54. **Olsen, K.N., Larsen, M.H., Gahan, C.G.M., Kallipolitis, B., Wolf, X.A., Rea, R., Hill, C. & Ingmer, H.** The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology-Sgm* 151, 925-933 (2005).
55. **Michan, C., Manchado, M., Dorado, G. & Pueyo, C.** *In vivo* transcription of the *Escherichia coli* oxyR regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *Journal of Bacteriology* 181, 2759-2764 (1999).
56. **Reindel, S., Schmidt, C.L., Anemuller, S. & Matzanke, B.F.** Expression and regulation pattern of ferritin-like DpsA in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *Biometals* 19, 19-29 (2006).
57. **Wiedenheft, B., Mosolf, J., Willits, D., Yeager, M., Dryden, K.A., Young, M. & Douglas, T.** An archaeal antioxidant: Characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10551-10556 (2005).
58. **Gupta, S., Pandit, S.B., Srinivasan, N. & Chatterji, D.** Proteomics analysis of carbon-starved *Mycobacterium smegmatis*: induction of Dps-like protein. *Protein Engineering* 15, 503-511 (2002).
59. **Hong, Y., Wang, G. & Maier, R.J.** *Helicobacter hepaticus* Dps protein plays an important role in protecting DNA from oxidative damage. *Free Radical Research* 40, 597-605 (2006).
60. **Halsey, T.A., Vazquez-Torres, A., Gravdahl, D.J., Fang, F.C. & Libby, S.J.** The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar typhimurium oxidative stress resistance and virulence. *Infection and Immunity* 72, 1155-1158 (2004).
61. **Ishikawa, T., Mizunoe, Y., Kawabata, S., Takade, A., Harada, M., Wai, S.N. & Yoshida, S.** The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 185, 1010-1017 (2003).
62. **Nair, S. & Finkel, S.E.** Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *Journal of Bacteriology* 186, 4192-4198 (2004).
63. **Moeck, G.S. & Coulton, J.W.** TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Molecular Microbiology* 28, 675-681 (1998).
64. **Koster, W.** ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B-12. *Research in Microbiology* 152, 291-301 (2001).
65. **Schlegel, H.** Allgemeine Mikrobiologie (Thieme, 1992).
66. **Pattus, F. & Abdallah, M.A.** Siderophores and iron-transport in microorganisms. *Journal of the Chinese Chemical Society* 47, 1-20 (2000).
67. **Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J. & Andrews, S.C.** Feo - Transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* 19, 143-157 (2006).
68. **Tsolis, R.M., Baumler, A.J., Heffron, F. & Stojiljkovic, I.** Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infection and Immunity* 64, 4549-4556 (1996).

69. **Stojiljkovic, I., Cobeljic, M. & Hantke, K.** *Escherichia coli* K12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *Fems Microbiology Letters* 108, 111-115 (1993).
70. **Hantke, K.** Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4, 172-177 (2001).
71. **McHugh, J.P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., Cooper, C.E. & Andrews, S.C.** Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli* - A new mechanism for iron homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 29478-29486 (2003).
72. **Rodriguez, G.M. & Smith, I.** Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Molecular Microbiology* 47, 1485-1494 (2003).
73. **Rodriguez, G.M.** Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology* 14, 320-327 (2006).
74. **Locke, M. & Nichol, H.** Iron economy in insects - transport, metabolism and storage. *Annual Review of Entomology* 37, 195-215 (1992).
75. **Nichol, H., Law, J.H. & Winzerling, J.J.** Iron metabolism in insects. *Annual Review of Entomology* 47, 535-559 (2002).
76. **Schildknecht, H., Birringer, H. & Krauß, D.** Aufklärung des gelben Prothorakalwehrdrüsen-Farbstoffes von *Ilybius fenestratus*. *Zeitschrift für Naturforschung* 24b, 28-47 (1969).
77. **Umebachi, Y. & Tsuchitani, K.** The presence of xanthurenic acid in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biochemistry* 42, 817-824 (1955).
78. **Wessing, A. & Eichelberg, D.** Die fluoreszierenden Stoffe aus den Malpighischen Gefäßen der Wildform und verschiedener Augenfarbenmutante von *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift für Naturforschung* 23b, 376-386 (1968).
79. **Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A.E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R.E. & Morris, H.R.** Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* 392, 289-292 (1998).
80. **Eisner, T., Morgan, R.C., Attygalle, A.B., Smedley, S.R., Herath, K.B. & Meinwald, J.** Defensive production of quinoline by a phasmid insect (*Oreophoetes peruana*). *Journal of Experimental Biology* 200, 2493-2500 (1997).
81. **Mossialos, D., Meyer, J.M., Budzikiewicz, H., Wolff, U., Koedam, N., Baysse, C., Anjaiah, V.L. & Cornelis, P.** Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 487-492 (2000).
82. **Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P. & Iglewski, B.H.** Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11229-11234 (1999).
83. **Frolova, V.I., Taig, M.M., Kuzovkov, A.D. & Katrukha, G.S.** Cinropeptin, a new antibiotic from *Act. cineraceus*. *Antibiotiki* 26, 323-327 (1981).

-
84. **BreidingMack, S. & Zeeck, A.** Secondary metabolites by chemical screening .1. Calcium 3-hydroxyquinoline-2-carboxylate from a *Streptomyces*. *Journal of Antibiotics* 40, 953-960 (1987).
85. **Lombo, F., Velasco, A., Castro, A., de la Calle, F., Brana, A.F., Sanchez-Puelles, J.M., Mendez, C. & Salas, J.A.** Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. *Chembiochem* 7, 366-376 (2006).
86. **Molinski, T.F. & Faulkner, D.J.** An antibacterial pigment from the sponge *Dendrilla membranosa*. *Tetrahedron Letters* 29, 2137-2138 (1988).
87. **Brack, A.** Antimikrobielle Wirkung von 8-Hydroxychinolin-Derivaten, besonders von einigen neuen Estern. *Arzneimittel-Forschung* 12, 133-144 (1962).
88. **Fiedler, H. & Kaben, U.** Antimykotische und antibakterielle Wirksamkeit von 8-Hydroxychinolinen und Nicotinsäureestern. *Pharmazie* 21, 233-238 (1966).
89. **Macnicol, P.K.** Isolation of 6-hydroxykynurenic acid from tobacco leaf. *Biochemical Journal* 107, 473-& (1968).
90. **Mendez, J. & Masa, A.** 6-hydroxykynurenic acid from *Thapsia villosa*. *Phytochemistry* 14, 1136-1137 (1975).
91. **Schennen, A. & Holzl, J.** 6-hydroxykynurenic acid, the 1st N-containing compound from the *Ginkgo biloba* leaf. *Planta Medica* 52, 235-236 (1986).
92. **Starratt, A.N. & Caveney, S.** Quinoline-2-carboxylic acids from *Ephedra* species. *Phytochemistry* 42, 1477-1478 (1996).
93. **Okabe, N. & Muranishi, Y.** Bis(8-hydroxyquinoline-2-carboxylato-[kappa]3N,O,O')cobalt(II) trihydrate. *Acta Crystallographica Section E* 58, m352-m353 (2002).
94. **Okabe, N. & Muranishi, Y.** 8-hydroxyquinaldinic acid and its nickel(II) complex. *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications* 58, M475-M477 (2002).
95. **Nakamura, M., Kitamura, C., Ueyama, H., Yamana, K. & Yoneda, A.** Crystal structure of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid copper(II) complex. *Analytical Sciences X-ray Structure Analysis Online* 21, x115-x116 (2005).
96. **McDonald, F.C., Applefield, R.C., Halkides, C.J., Reibenspies, J.H. & Hancock, R.D.** A thermodynamic and crystallographic study of complexes of the highly preorganized ligand 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid. *Inorganica Chimica Acta* 361, 1937-1946 (2008).
97. **Funke, M.** N-Fettsäure-Aminosäure-Konjugate und die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure aus dem Regurgitat von Lepidoptera Larven. *Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität, Jena* (2009).
98. **Linzen, B.** The tryptophan-ommochrome pathway in insects. *Advances in Insect Physiology* 10, 117-246 (1974).
-

99. **Wei, H.F., Leeds, P., Chen, R.W., Wei, W.L., Leng, Y., Bredesen, D.E. & Chuang, D.M.** Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: Characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. *Journal of Neurochemistry* 75, 81-90 (2000).
100. **Fetzner, S. & Lingens, F.** Microbial metabolites of quinoline and related compounds. 18. Purification and some properties of the molybdenum-containing and iron-containing quinaldic acid 4-oxidoreductase from *Serratia marcescens* 2CC-1. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 374, 363-376 (1993).
101. **Sauter, M., Tshisuaka, B., Fetzner, S. & Lingens, F.** Microbial metabolism of quinoline and related compounds. 20. Quinaldic acid 4-oxidoreductase from *Pseudomonas* sp. AK-2 compared to other prokaryotic molybdenum-containing hydroxylases. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 374, 1037-1046 (1993).
102. **Takahashi, H. & Price, J.M.** Dehydroxylation of xanthurenic acid to 8-hydroxyquinaldic acid. *Journal of Biological Chemistry* 233, 150-153 (1958).
103. **Roy, J.K., Brown, R.R. & Price, J.M.** 8-hydroxyquinaldic acid - red fluorescent substance in the urine of pyridoxine-deficient rats. *Nature* 184, 1573-1574 (1959).
104. **Kaihara, M. & Price, J.M.** Metabolism of quinaldic acid, kynurenic acid and xanthurenic acid in rabbit. *Journal of Biological Chemistry* 237, 1727-1729 (1962).
105. **Kaihara, M. & Price, J.M.** Effect of feeding neomycin on dehydroxylation of xanthurenic acid to 8-hydroxyquinaldic acid by rabbit. *Federation Proceedings* 22, 4082-4084 (1963).
106. **Moore, B.P. & Brown, W.V.** Identification of warning odour components, bitter principles and antifeedants in an aposematic beetle: *Metriorrhynchus rhipidius* (Coleoptera: Lycidae). *Insect Biochemistry* 11, 493-499 (1981).
107. **Wang, S.F., Braekman, J.C., Daloze, D., Pasteels, J., Soetens, P., Handjieva, N.V. & Kalushkov, P.** N alpha-quinaldyl-L-arginine HCl, a new defensive alkaloid from *Subcoccinella-24-punctata* (Coleoptera, Coccinellidae). *Experientia* 52, 628-630 (1996).
108. **Ping, L.Y.** Biosynthese von N-Acylglutaminen im Insektendarm: Beteiligung und Charakterisierung bakterieller Enzyme. *Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität, Jena* (2005).
109. **Delong, E.F.** Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5685-5689 (1992).
110. **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254 (1976).
111. **Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-& (1970).
112. **Manchenko, G.P.** Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels (CRC Press, 1994).

-
113. **Derdau, V., Atzrodt, J. & Holla, W.** H/D-exchange reactions with hydride-activated catalysts. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* 50, 295-299 (2007).
114. **Trachtenberg, E. & Whall, T.** Mechanism of bimolecular nucleophilic substitution in beta-halo ketones and related compounds. *Journal of Organic Chemistry* 37, 1494-& (1972).
115. **Vanderzant, E.S.** Dietary requirements of bollworm *Heliothis zea* (Lepidoptera, Noctuidae) for lipids, choline and inositol and effect of fats and fatty acids on composition of body fat. *Annals of the Entomological Society of America* 61, 120-& (1968).
116. **Davenport, A.P. & Wright, D.J.** Physiological saline for the larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) based on an analysis of the hemolymph. *Journal of Economic Entomology* 78, 1151-1153 (1985).
117. **Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. & Stackebrandt, E.** *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: Bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology* 51, 47-72 (1997).
118. **Hajek, A.** Natural Enemies. An Introduction to Biological Control (Cambridge University Press, 2004).
119. **Kellen, W.R., Clark, T.B., Lindegre, Je, Ho, B.C., Rogoff, M.H. & Singer, S.** *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* 7, 442-& (1965).
120. **Anraku, Y. & Gennis, R.B.** The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences* 12, 262-266 (1987).
121. **Benov, L., Sage, H. & Fridovich, I.** The copper- and zinc-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*: Molecular weight and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340, 305-310 (1997).
122. **Fee, J.A.** Regulation of SOD genes in *Escherichia coli* - Relevance to superoxide dismutase function. *Molecular Microbiology* 5, 2599-2610 (1991).
123. **Brady, S.F. & Clardy, J.** Long-chain *N*-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. *Journal of the American Chemical Society* 122, 12903-12904 (2000).
124. **Brady, S.F., Chao, C.J. & Clardy, J.** Long-chain *N*-acyltyrosine synthases from environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6865-6870 (2004).
125. **Brady, S.F. & Clardy, J.** *N*-acyl derivatives of arginine and tryptophan isolated from environmental DNA expressed in *Escherichia coli*. *Organic Letters* 7, 3613-3616 (2005).
126. **Koreishi, M., Zhang, D.M., Imanaka, H., Imamura, K., Adachi, S., Matsuno, R. & Nakanishi, K.** A novel acylase from *Streptomyces mobaraensis* that efficiently catalyzes hydrolysis/synthesis of capsaicins as well as *N*-Acyl-L-amino acids and *N*-acyl-peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 72-78 (2006).

127. **Peypoux, F., Laprevote, O., Pagadoy, M. & Wallach, J.** *N*-Acyl derivatives of Asn, new bacterial *N*-acyl D-amino acids with surfactant activity. *Amino Acids* 26, 209-214 (2004).
128. **Funke, M., Büchler, R., Mahobia, V., Schneeberg, A., Ramm, M. & Boland, W.** Rapid hydrolysis of quorum-sensing molecules in the gut of lepidopteran larvae. *Chembiochem* 9, 1953-1959 (2008).
129. **Yasuda, N., Kaneko, M. & Kimura, Y.** Isolation, purification and characterization of a new enzyme from *Pseudomonas* sp. M-27, carboxypeptidase-G(3). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56, 1536-1540 (1992).
130. **Harrison, P.M. & Arosio, P.** Ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1275, 161-203 (1996).
131. **d'Hardemare, A.D., Serratrice, G. & Pierre, J.L.** Synthesis and iron-binding properties of quinolobactin, a siderophore from a pyoverdine-deficient *Pseudomonas fluorescens*. *Biometals* 17, 691-697 (2004).
132. **Vallet-Gely, I., Lemaitre, B. & Boccard, F.** Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology* 6, 302-313 (2008).
133. **Weinberg, E.D.** Iron availability and infection. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1790, 600-605 (2009).
134. **Ong, S.T., Ho, J.Z.S., Ho, B. & Ding, J.L.** Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* 211, 295-314 (2006).
135. **Ganz, T.** Iron in innate immunity: starve the invaders. *Current Opinion in Immunology* 21, 63-67 (2009).
136. **Lee, C.H. & Lee, H.S.** Growth inhibiting activity of quinaldic acid isolated from *Ephedra pachyclada* against intestinal bacteria. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 52, 331-335 (2009).
137. **McKay, M.J., Carroll, A.R. & Quinn, R.J.** Perspicamides A and B, quinolinecarboxylic acid derivatives from the Australian ascidian *Botrylloides perspicuum*. *Journal of Natural Products* 68, 1776-1778 (2005).

Anhang

Abkürzungen

µg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µmol	Mikromol (10^{-6} Mol)
2D	2-Dimensional
3HK-d3	3-fach deuteriertes 3-Hydroxykynurenin
3-HQA	3-Hydroxychinolin-2-carbonsäure
8-HQA	8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure
8-HQA-d2	2-fach deuterierte 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure
8-HQA-d3	3-fach deuterierte 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure
AAH	<i>N</i> -Acylaminosäurehydrolase
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
<i>afp</i>	<i>amide forming protein</i>
ALEX	<i>anion-exchange chromatography</i> (Anionenaustauschchromatographie)
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BHI	<i>brain heart infusion</i> (Herz-Hirn-Bouillon)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CO	Cytochromoxidase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPS	<i>DNA-protecting protein under starved conditions</i>

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fur	<i>ferric uptake regulator</i>
g	Gramm
GC	Guanin-Cytosin
GDH, <i>gdh</i>	Glutamatdehydrogenase
h	Stunde
hPa	Hektopascal (10^2 Pascal)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICP	<i>inductively coupled plasma</i> (induktiv gekoppeltes Plasma)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare (10^3 Basenpaare)
kDa	Kilodalton (10^3 Dalton)
K_M	Michaeliskonstante
KS-d1	1-fach deuterierte Kynurensäure
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Molar
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mM	Millimolar (10^{-3} Molar)
mmol	Millimol (10^{-3} Mol)
MS	Massenspektrometrie
MTT	Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)

MWCO	<i>molecular weight cut off</i> (Porengröße der Membran)
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Bethesda MD, USA
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
nmol	Nanomol (10^{-9} Mol)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PMS	Phenazinmethosulfat
PUOX, <i>puo</i>	Putrescinoxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SE	<i>size exclusion</i> (Größenausschluss)
SOD, <i>sod</i>	Superoxiddismutase
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp-d5	5-fach deuteriertes L-Tryptophan
Tween® 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
v/v	Volumen pro Volumen
XS-d2	2-fach deuterierte Xanthurensäure

Danksagung

Ich möchte ganz besonders Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in seiner Abteilung anzufertigen. Herzlichen Dank für sehr viele Ideen und interessante Hinweise im Laufe der Zeit. Ihm und der gesamten Abteilung für bioorganische Chemie am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie gilt mein Dank für etliche lohnende wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Erika Kothe für die Betreuung meiner Arbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für ihr Interesse an dem Thema und viele hilfreiche Ratschläge.

Dr. Rita Büchler danke ich ganz herzlich für die Rundumbetreuung in Labor und Büro, für ihre Hilfsbereitschaft in so vielen praktischen Fragen und ihren Rat in allen Lebenslagen.

Herrn Dr. Dirk Merten (Institut für Geowissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena) möchte ich für die Bestimmung des Eisengehaltes im Regurgitat danken.

Herrn Prof. Dr. Konrad Dettner (Universität Bayreuth) möchte ich danken für die Bereitstellung der Bakterienstämme.

Vielen Kollegen gilt es zu danken:

Ein besonderer Dank gilt Angelika Berg für die liebevolle Pflege der Raupen und Käfer.

Anja Strauß danke ich für nette aber leider seltene Gespräche auf verschiedenen gemeinsamen Dienstreisen.

Anne Behrend danke ich für die Beantwortung etlicher Promotionsverfahren-bezogener Fragen.

Dr. Antje Burse danke ich für die Hilfe mit den Southern Blots.

Dr. Axel Mithöfer, Dr. Rita Büchler und Daniela Schmid danke ich für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Daniela Schmid möchte ich für Hilfe mit der 2D-Elektrophorese, für mehrere engagierte Insektenfunde (*Agabus* sp., *Malacosoma* sp. und *A. urticae*), aber auch für ihre private Freundschaft danken.

Dr. Dieter Spiteller gilt mein herzlichster Dank für seine unzähligen Ideen und seine enorme Hilfsbereitschaft in Sachen Massenspektrometrie und vielem mehr.

Grit Winnefeld danke ich für die nette Hilfe in allen verwaltungstechnischen Dingen des Alltags.

Ilka Schoenian möchte ich für zahlreiche interessante Gespräche über Eisenchelatoren und Substanzen unbegreiflicher Funktion danken. Außerdem herzlichen Dank für die Hilfe mit Massenspektrometern, Agardiffusionstests, Pilzkulturen und vielem mehr.

Jeannette Kley danke ich für über vier Jahre gute Büro-Gemeinschaft und nette Gespräche vom ersten Tag an.

Ein großer Dank gilt Dr. Jiří Svoboda für die Deuterierungen und für viel Hilfe bei dem Erschließen möglicher Biosynthesewege.

Ein ganz herzlicher Dank an Kerstin Ploß für sehr viel praktische Hilfe in allen Fragen der instrumentellen Analytik.

Dr. Liyan Ping und Xiaoshu Tang möchte ich für ihre Arbeit an den Insektendarmpopulationen danken.

Dr. Maritta Kunert danke ich für die verschiedenen Käferarten und für die Tipps bei der Mikroinjektion.

Dr. Matthias Funke möchte ich herzlich für gute Zusammenarbeit und die Einführung in das 8-HQA-Thema danken.

Roy Kirsch möchte ich für die Wasserkäferbestimmung danken.

Sindy Frick danke ich für die Hilfe beim Sezieren der *Spodoptera*-Larven.

Stefan Garms und Dr. Stefan Bartram danke ich für ihre Hilfe mit dem 8-HQA-Biosyntheseweg.

Anderen möchte ich einfach für die nette Arbeitsatmosphäre, gute Kooperation oder praktische Hilfe im Arbeitsalltag danken: Amarsanaa Badgaa, Andrea Lehr, Anja David,

Anne Morgenstern, Dr. Christian Kost, Dr. Enkhmaa Dagvadorj, Erika Arias Cordeo, Felix Bertels, Franziska Buch, Guanjun Li, Dr. Gunbilig Disan, Dr. Heiko Maischak, Holger Merker, Huijuan Guo, Janine Hofmann, Dr. Jyothilakshmi Vadassery, Dr. Karla Tolzin-Banasch, Luise Schönemann, Sandra Klemmer, Dr. Paulina Dąbrowska, Sandy Rottloff, Sabrina Discher, Raphael Seidel, Rhadika Venkatesan, Yamuna Sahadevan, Yongqi Shao, u.v.a.

Der Abteilung für Entomologie danke ich für die Möglichkeit ihre Dunkelkammer nutzen zu dürfen. Auch haben mir einige Mitarbeiter dieser Abteilung mehrfach geholfen:

Bianca Ulitzsch und Dr. Susanne Preiß möchte ich für die Hilfe mit dem ECL-Detektionssystem danken. Sebastian Schöne danke ich für Tipps und Tricks bei der Mikroinjektion. Regina Seibt danke ich für die *Heliothis*- und *S. frugiperda*-Larven. Jutta Steffen möchte ich für die *P. xylostella*-Larven danken.

Der Abteilung für Biochemie danke ich für die *M. sexta*-Larven.

Den Mitgliedern der Abteilung für Massenspektroskopie Dr. Alexandr Muck und Antje Loele möchte ich für die Proteinsequenzierungen danken.

Meinen Eltern Angelika Kinder und Thomas Pesek danke ich für die Ermöglichung meines Studiums und die darin eingeschlossenen Auslandsaufenthalte. Danke an meine Mutter für das Finden der *Yponomeuta*-Larven und für abschließende Kommafehlersuche.

Meinem Freund Mathias Pusch danke ich unter anderem für die tatkräftige Unterstützung auf der Suche nach Raupen. Aber noch viel mehr danke ich ihm für alles andere das nicht auf diese Seiten passt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Jelena Pesek
Geburtsdatum/ort 20.12.1981 in Dortmund

Schulausbildung

1987-1991 Gemeindeschule Lichtenbusch, Belgien
1991-2000 Viktoriaschule Aachen, Abitur Juni 2000

Hochschulausbildung

9/2000-11/2005 Studium Bioingenieurwesen an der Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
Abschluss: Dipl.-Ing. (FH)
8/2002-8/2003 Studium der Biologie an der mitthögskolan Sundsvall, Schweden
1/2005-9/2005 Diplom/Masterarbeit an der Umeå universitet, Schweden (Institutionen för molekylärbiologi). Thema: Regulatorische Effekte eines Exopolysaccharid-Transport-Operons *wza-wzb-wzc* im Quorum Sensing-System von *Vibrio anguillarum*. Abschluss: Master of Science

Praktische Erfahrung

6/2000-9/2000 Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie, Arbeitsgruppe Enzyme
7/2001-8/2001 Firma Geotaix Umwelttechnologie, Würselen.
Anschließend weitere Tätigkeit als studentische Hilfskraft
2/2003-5/2003 Mitthögskolan Sundsvall, Institutionen för naturvetenskap. Thema: Der Einfluss von Cadmium, Aluminium und Holzasche auf *Euglena gracilis*.
8/2004-12/2004 Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven
Thema: Der Einfluss der Lichtintensität auf Expression und mRNA-Degradation von *psbA* in zwei marinen Diatomeenarten.
12/2005-1/2006 Universität zu Köln, Botanisches Institut, Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Melkonian

Dissertation

seit 4/2006 Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Bioorganische Chemie. Thema: Funktionelle Aspekte biologisch aktiver Komponenten aus dem Regurgitat von *Spodoptera littoralis*-Larven.

Publikationen

J. Pesek, R. Büchler, W. Boland, R. Albrecht, K. Zeth. The structure of AAH from *Microbacterium arborescens*, an unusual Dps enzyme with novel catalytic activity. *In Vorbereitung*.

J. Pesek, J. Svoboda, W. Boland. Biosynthetic pathway of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid, a compound from the gut of *Spodoptera* larvae. *In Vorbereitung*

Vorträge

5/2009 Doktorandenworkshop Naturstoffe: Chemie, Biologie und Ökologie, Universität Bayreuth: J. Pesek and W. Boland. 8-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (HQA) from the insect gut impacts bacterial growth via iron chelation.

8/2009 ISCE Annual Meeting, Neuchâtel (Schweiz): J. Pesek and W. Boland. 8-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (HQA), an iron chelator from the insect gut.

Poster

8/2009 ISCE Annual Meeting, Neuchâtel (Schweiz): K. Zeth, R. Büchler, J. Pesek, W. Boland. AAH from insect gut bacterium *Microbacterium arborescens*: crystal structure, Peroxidase properties and regulation.

7/2010 Ento10, Swansea (Großbritannien): J. Pesek, J. Svoboda and W. Boland. Biosynthetic pathway of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid, a compound from the gut of *Spodoptera* larvae.

8/2010 ISCE Annual Meeting, Tours (Frankreich): J. Pesek, J. Svoboda and W. Boland. Biosynthetic pathway of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid, a compound from the gut of *Spodoptera* larvae.

Erklärung

Jena, 29. Juni 2010

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt. Die vorliegende Dissertation habe ich selbständig verfasst, keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts haben mich die in der Danksagung meiner Dissertation genannten Personen unterstützt. Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen. Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ferner habe ich nicht versucht, diese Arbeit oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

Jelena Pesek